

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der
Universität Marburg
Direktor: Prof. Dr. med. W. Schmid

**Untersuchungen über den Mechanismus
der cytostatischen Wirkung von
 β -chlorierten Methylhydrazinen an Hefezellen
(*Saccharomyces cerevisiae*)**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der gesamten Zahnheilkunde
des Fachbereichs Humanmedizin
der

Philipps-Universität Marburg/Lahn

vorgelegt von

Ulrike Mangold, geb. Säcker

aus Gelsenkirchen

Marburg 1975

Fotodruck: Erich Mauersberger, Marburg

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der
Universität Marburg
Direktor: Prof. Dr. med. W. Schmid

**Untersuchungen über den Mechanismus
der cytostatischen Wirkung von
 β -chlorierten Methylhydrazinen an Hefezellen
(*Saccharomyces cerevisiae*)**

Inaugural-Dissertation

zur

**Erlangung des Doktorgrades der gesamten Zahnheilkunde
des Fachbereichs Humanmedizin**

der

Philipps-Universität Marburg/Lahn

vorgelegt von

Ulrike Mangold, geb. Säcker

aus Gelsenkirchen

Marburg 1975

Fotodruck: Erich Mauersberger, Marburg



Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Universität Marburg am: 21.11.1975
Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Dekan: Prof. Dr. med. H. Oepen
Referent: Prof. Dr. med. W. Schmid
Correferent: Prof. Dr. med. dent. H. Bernhardt

INVENTAR

Seite

A. Bücher

B. Manuskripte

C. Briefe

1. Briefe	1
2. Briefe an die Eltern	2
3. Briefe an die Freunde	3
4. Briefe an die Lehrer	4
5. Briefe an die Verwandten	5
6. Briefe an die Bekannten	6
7. Briefe an die Fremden	7
8. Briefe an die Tote	8
9. Briefe an die Lebenden	9
10. Briefe an die Unbekannten	10
11. Briefe an die Bekannten	11
12. Briefe an die Fremden	12
13. Briefe an die Tote	13
14. Briefe an die Lebenden	14
15. Briefe an die Unbekannten	15

Meinen lieben Eltern.

D. Briefe

1. Briefe an die Eltern	1
2. Briefe an die Freunde	2
3. Briefe an die Lehrer	3
4. Briefe an die Verwandten	4
5. Briefe an die Bekannten	5
6. Briefe an die Fremden	6
7. Briefe an die Tote	7
8. Briefe an die Lebenden	8
9. Briefe an die Unbekannten	9
10. Briefe an die Bekannten	10
11. Briefe an die Fremden	11
12. Briefe an die Tote	12
13. Briefe an die Lebenden	13
14. Briefe an die Unbekannten	14
15. Briefe an die Bekannten	15
16. Briefe an die Fremden	16
17. Briefe an die Tote	17
18. Briefe an die Lebenden	18
19. Briefe an die Unbekannten	19
20. Briefe an die Bekannten	20
21. Briefe an die Fremden	21
22. Briefe an die Tote	22
23. Briefe an die Lebenden	23
24. Briefe an die Unbekannten	24
25. Briefe an die Bekannten	25
26. Briefe an die Fremden	26
27. Briefe an die Tote	27
28. Briefe an die Lebenden	28
29. Briefe an die Unbekannten	29
30. Briefe an die Bekannten	30
31. Briefe an die Fremden	31
32. Briefe an die Tote	32
33. Briefe an die Lebenden	33
34. Briefe an die Unbekannten	34
35. Briefe an die Bekannten	35
36. Briefe an die Fremden	36
37. Briefe an die Tote	37
38. Briefe an die Lebenden	38
39. Briefe an die Unbekannten	39
40. Briefe an die Bekannten	40
41. Briefe an die Fremden	41
42. Briefe an die Tote	42
43. Briefe an die Lebenden	43
44. Briefe an die Unbekannten	44
45. Briefe an die Bekannten	45
46. Briefe an die Fremden	46
47. Briefe an die Tote	47
48. Briefe an die Lebenden	48
49. Briefe an die Unbekannten	49
50. Briefe an die Bekannten	50
51. Briefe an die Fremden	51
52. Briefe an die Tote	52
53. Briefe an die Lebenden	53
54. Briefe an die Unbekannten	54
55. Briefe an die Bekannten	55
56. Briefe an die Fremden	56
57. Briefe an die Tote	57
58. Briefe an die Lebenden	58
59. Briefe an die Unbekannten	59
60. Briefe an die Bekannten	60
61. Briefe an die Fremden	61
62. Briefe an die Tote	62
63. Briefe an die Lebenden	63
64. Briefe an die Unbekannten	64
65. Briefe an die Bekannten	65
66. Briefe an die Fremden	66
67. Briefe an die Tote	67
68. Briefe an die Lebenden	68
69. Briefe an die Unbekannten	69
70. Briefe an die Bekannten	70
71. Briefe an die Fremden	71
72. Briefe an die Tote	72
73. Briefe an die Lebenden	73
74. Briefe an die Unbekannten	74
75. Briefe an die Bekannten	75
76. Briefe an die Fremden	76
77. Briefe an die Tote	77
78. Briefe an die Lebenden	78
79. Briefe an die Unbekannten	79
80. Briefe an die Bekannten	80
81. Briefe an die Fremden	81
82. Briefe an die Tote	82
83. Briefe an die Lebenden	83
84. Briefe an die Unbekannten	84
85. Briefe an die Bekannten	85
86. Briefe an die Fremden	86
87. Briefe an die Tote	87
88. Briefe an die Lebenden	88
89. Briefe an die Unbekannten	89
90. Briefe an die Bekannten	90
91. Briefe an die Fremden	91
92. Briefe an die Tote	92
93. Briefe an die Lebenden	93
94. Briefe an die Unbekannten	94
95. Briefe an die Bekannten	95
96. Briefe an die Fremden	96
97. Briefe an die Tote	97
98. Briefe an die Lebenden	98
99. Briefe an die Unbekannten	99
100. Briefe an die Bekannten	100

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A. <u>Einleitung</u>	1
B. <u>Material und Methoden</u>	
B.I. <u>Material</u>	4
1. Hefe	4
2. Nährlösung nach Williamson	4
3. Vitaminstammlösungen	4
4. Hemmsubstanzen	4
5. Radioaktiv-markierte Substanzen	4
6. PEI-Cellulose	5
7. Szintillationslösung	5
8. Reagenzien	5
B.II <u>Methoden</u>	
1. Synchronisationsverfahren	5
2. Anordnung der Einbauversuche	6
3. Hefezellaufschluß mit 6 %iger Perchlorsäure	7
4. Methoden zur Trennung von RNS und DNS	8
5. Methoden zur optischen Bestimmung der löslichen Nukleobausteine, DNS, RNS und Proteine	9
6. Analyse des kalten Perchlorsäureextraktes durch chromatographische Auftrennung mit Hilfe einer PEI-Cellulose-Säule	10
a) Versuchsanordnung und Gewinnung des kalten Perchlorsäureextraktes	10
b) Anfertigung der PEI-Cellulose-Säulen	11
c) Auftrennung des kalten Perchlorsäureextraktes	11
7. Aktivitätsmessungen	12
8. Auswertung der Ergebnisse	13
a) der Wachstum-Einbauversuche	13
b) der säulenchromatographischen Trennung	13

C. <u>Ergebnisse</u>	14
C.I. <u>Uracil-Einbaustudium in wachsenden Hefezellen unter verschiedenen Wachstumsbedingungen</u>	14
1. Synchronisierte Hefezellen unter Vermehrungsbedingungen	14
a) Uracil-Einbau unter dem Einfluß von N-Methyl-N- β -chloräthylhydrazin-Hydrochlorid*	14
b) Uracil-Einbau unter dem Einfluß von N-Methyl-N- β -chloräthylbenzaldehydhydrazon-Hydrochlorid**	18
c) Uracil-Einbau unter dem Einfluß von N,N-Dimethylhydrazin	18
2. Synchronisierte Hefezellen unter Zusatz der Vermehrungstoffe nach drei Stunden	22
a) Uracil-Einbau unter dem Einfluß von "Hydrazin"	22
b) Uracil-Einbau unter dem Einfluß von "Hydrazon"	25
3. Unsynchronisierte Hefezellen	27
a) Uracil-Einbau unter dem Einfluß von "Hydrazin"	27
b) Uracil-Einbau unter dem Einfluß von "Hydrazon"	31
4. Vergleichende Zusammenfassung über die hemmenden Einflüsse auf den (6- 3 H)-Uracil-Einbau in Hefe unter verschiedenen Wachstumsbedingungen durch "Hydrazin" und "Hydrazon"	33
C.II. <u>Leucin-Einbaustudium an wachsenden Hefezellen unter verschiedenen Wachstumsbedingungen</u>	35
1. Synchronisierte Hefezellen unter Vermehrungsbedingungen	35
a) Leucin-Einbau unter dem Einfluß von "Hydrazin"	35
b) Leucin-Einbau unter dem Einfluß von "Hydrazon"	37
c) Leucin-Einbau unter dem Einfluß von N,N-Dimethylhydrazin	40

* im folgenden Text als "Hydrazin" beschrieben

** im folgenden Text als "Hydrazon" beschrieben

2. Synchronisierte Hefezellen unter Zusatz der Vermehrungsstoffe nach 3 Stunden	43
a) Leucin-Einbau unter dem Einfluß von "Hydrazin"	43
b) Leucin-Einbau unter dem Einfluß von "Hydrazon"	45
3. Unsynchronisierte Hefezellen	49
a) Leucin-Einbau unter dem Einfluß von "Hydrazin"	49
b) Leucin-Einbau unter dem Einfluß von "Hydrazon"	52
4. Vergleichende Zusammenfassung über die hemmenden Einflüsse auf den L(U- 14 C)-Leucin-Einbau in Hefe unter verschiedenen Wachstumsbedingungen durch "Hydrazin" und "Hydrazon"	54

C.III. Ergebnisse aus DNS-Markierungsversuchen 56

C. IV. Säulenchromatographische Trennung der säurelöslichen Nukleobausteine 58

1. Verteilung des Uracil unter dem Einfluß von "Hydrazin"	58
2. Verteilung des Uracil unter dem Einfluß von "Hydrazon"	58
3. Verteilung des Uracil unter dem Einfluß von N,N-Dimethylhydrazin	60

D. Diskussion 63

E. Zusammenfassung 65

F. Literaturverzeichnis 67

A. Einleitung

Hydrazinderivate nehmen in dem der praktischen Medizin zur Verfügung stehenden Arzneimittelschatz einen festen Platz ein und können in verschiedenen Anwendungsbereichen erfolgreich eingesetzt werden. So wirken z. B. die MAO-Hemmer (1) als Thymoleptika. Als Nebenwirkungen treten jedoch schwere vegetative Störungen auf. Die Tuberkulose kann mit Erfolg durch die Hydrazinderivate Isonicotinsäurehydrazid (2), seine Hydrazone (3) und Cyanessigsäurehydrazid (4) behandelt werden. Die Hydralazine (5) können wegen ihrer starken Wirkung auf die Gefäßmuskulatur als Antihypertonika Verwendung finden, werden aber auf Grund ihrer hohen Toxizität nur in Mischpräparaten mit anderen Hochdruckmitteln verwendet. Die Hydrazone und Semicarbazide des 5-Nitrofurals (6) besitzen gute chemotherapeutische Eigenschaften. Die Erkenntnis, daß Hydrazin und Hydrazinabkömmlinge eine cytostatische Wirkung ausüben, setzte eine bis heute noch nicht abgeschlossene Entwicklung in Gang. So fanden SCHMID und MÜLLER (7) eine Beeinflussung der Glykolyse und des Zellwachstums in vitro bei Bäckerhefe (*Sacch. cerevisiae*) und Ehrlich-Ascitescarcinomzellen durch Hydrazin und Äthylhydrazine. WEITZEL, SCHNEIDER et al. (8) konnten einen solchen cytostatischen Effekt auch in vivo beim Ehrlich-Asciteszellcarcinom der Maus nachweisen. Nach GOLD (9) wirken sie auch bei anderen Tiertumoren. Aber auch höhere Hydrazinderivate wie z. B. 1-Acetyl-2-Picolinoylhydrazin (10), 2-Hydrazino-5-nitropyridin (11), INH (12) oder Dithiocarbamoylhydrazine (13) wirken hemmend auf die verschiedenen experimentellen Tiertumoren ein. Neben der cytostatischen Wirkung besitzen die Hydrazine, besonders die einfachen Methylhydrazine, auch stark cancerogene Eigenschaften (14, 15). Bei *E. coli* wirken Methylhydrazine mutagen (16). Von allen untersuchten Hydrazinen konnte sich bis heute nur das Procarbazin (Natulan^(R)) durchsetzen, das vorwiegend zur Therapie der Lymphogranulomatose herangezogen wird. Nach BOLLAG und GRUNBERG (17) ist das Vorhandensein der Methylgruppe essentiell. In dieser Arbeit soll nun über die Wirksamkeit eines

neuen Hydrazinderivates, dem kürzlich von BÖHME und MARTIN (18) synthetisierten N-Methyl-N- β -chloräthylhydrazin-hydrochlorid und seinem Benzaldehydhydrazon, dem N'-Methyl-N'- β -chloräthylbenzaldehydhydrazon-hydrochlorid berichtet werden. Die Verbindungen sind einerseits Methylhydrazine, tragen aber andererseits eine β -Chloräthylgruppe, deren cytostatische Wirkung in Form der Stickstoff-Lostabkömmlinge hinreichend bekannt ist (19). Aber auch das N,N-Bis-(β -chloräthyl)-hydrazin (20) wurde als wirksames Agens bei Tiertumoren von PREUSSMANN und SCHMÄHL erkannt. Um die hohe Toxizität zu senken, stellen SCHULZE und LETSCH (21) zahlreiche Hydrazone dieser Verbindungen her, in der Annahme, zu einer weniger giftigen Transportform zu gelangen. Dies veranlaßte uns, ebenfalls ein Hydrazon des N-Methyl-N- β -chloräthylhydrazin zu untersuchen.

Statt Tumorzellen werden des öfteren auch Hefezellen als Testobjekt zur Prüfung wachstumshemmender Substanzen herangezogen. So wird u. a. der Einfluß von Antimetaboliten wie 5-Fluoruracil und 6-Azauracil (22), Nitrosoamide (23), 1,3-Bis-(2-chloräthyl)-1-nitroso-harnstoffe (24), 1-Methyl-3-Nitro-1-nitrosoguanidine (25), N,N-Dimethylhydrazin (26) und Hydroxyharnstoff (27) auf *Sacch. cerevisiae* beschrieben. Hefezellen können aber auch als Testobjekt für genetisch aktive Metaboliten von Cytostatika benutzt werden (28).

Die Hefezellen bieten gegenüber den häufig in der Forschung verwendeten Impftumoren manche methodische Vorteile. So können zum Beispiel die Hefezellen *in vitro* sehr leicht in einem geeigneten Nährmedium kultiviert werden. Ihre schnelle Generationsfolge und die Widerstandsfähigkeit äußeren Einflüssen gegenüber, bietet die Möglichkeit, Teilungs- und Stoffwechselvorgänge unter dem Einfluß cytostatisch wirksamer Substanzen in unkomplizierten Versuchsanordnungen und über relativ kurze Zeiten zu erfassen. Gleichzeitig können auch antimykotische Effekte erfaßt werden. Eine Erleichterung zur Beurteilung der cytostatischen Effekte bieten

teilungssynchronisierte Hefezellen, die durch ein einfaches Verfahren (29) in ausreichender Menge zur Verfügung gestellt werden können.

Bei diesen Modellversuchen müssen allerdings zwei unterschiedene Nachteile berücksichtigt werden: die Versuchszeit bei Untersuchungen an sich vermehrender Hefe ist dadurch begrenzt, daß sich die Hefezellen ab einer gewissen Konzentration langsamer teilen, d.h. daß nach einem bestimmten Zeitpunkt echte cytotostatische Effekte durch diese Teilungshemmung überlagert werden können. Als weiterer Nachteil hat sich im Laufe der Untersuchungen erwiesen, daß keine zuverlässige Methode zur DNS-Markierung gefunden werden konnte, die es erlaubt, Störungen durch gleichzeitige RNS-Markierung zu eliminieren (vgl. Teil C. III).

In der vorliegenden Arbeit nun sollte die Wirkung des N-Methyl-N- β -chloräthylhydrazin-hydrochlorid und des N'-Methyl-N'- β -chloräthyl-benzaldehydhydrazon-hydrochlorid auf den Einbau von Uracil und Leucin in Hefezellen unter verschiedenen Wachstumsbedingungen untersucht werden, nachdem BRAUN und LANGE (30) bereits eine starke Beeinflussung des Wachstums, der Zellvermehrung und der Glykolyse nachweisen konnten. Bei diesen Untersuchungen stellte sich heraus, daß das Procarbazin völlig ohne Einfluß auf die Entwicklung von Hefezellen ist, weshalb es in der vorliegenden Arbeit auch nicht als Vergleichssubstanz herangezogen wurde. Anschließend sollte die säulenchromatographische Trennung des kalten Perchlorsäureextraktes Aufschluß darüber geben, bis zu welcher Stufe und in welchem Ausmaß das aufgenommene Uracil ribosyliert bzw. phosphoryliert wird. Als Vergleichssubstanz zu den untersuchten Hemmstoffen wurde das asymmetrische N,N-(Dimethyl)-hydrazin herangezogen.

B. Material und Methoden

B.I. Material

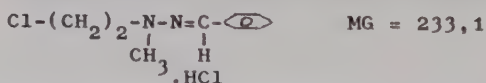
1. Für alle Versuche wurde frische Bäckerhefe (*Sacch. cerevisiae*, einheitlich diploider Stamm) der Firma Moormann, Werne, verwendet.
2. Zum Einbaustudium von (6-³H)-Uracil und L-(U-¹⁴C)-Leucin wurden die Hefezellen in einer Nährlösung nach WILLIAMSON und SCOPES (31) mit folgender Zusammensetzung kultiviert: für Wachstum: 34,0 g Glucose, 1,98 g (NH₄)₂ SO₄, 0,74 g KCl, 0,51 g MgCl₂·6H₂O, 0,35 g CaCl₂·2H₂O, 27,2 g Na₂HPO₄·12H₂O, und 5,04 Citronensäure ad 1000 ml Aq.dest. (Substanzen der Firma Merck, Darmstadt).
3. Als Vermehrungsmedium wurden auf 1000 ml Nährlösung jeweils 1 ml der Vitaminstammlösungen von B₁ und B₆ in 10⁻³ mg/% und Biotin in 10⁻⁴ mg/% Konzentration zugegeben.

4. Als cytotatisch wirksame Substanzen wurden eingesetzt:

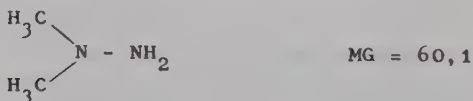
a) N-Methyl-N-β-chloräthylhydrazin-Hydrochlorid



b) N-Methyl-N-β-chloräthylbenzaldehydhydrazon-Hydrochlorid



c) Asymmetrisches N,N-Dimethylhydrazin



5. Zur radioaktiven Markierung wurden folgende Substanzen der Firma Amersham Buchler, Braunschweig verwendet:

(6-³H)-Uracil 190 mCi/mg

L-(U-¹⁴C)-Leucin 348 mCi/mmol

Thymidin-2-¹⁴C-5-monophosphat als NH₄-Salz 61 mCi/mmol

6. Die säulenchromatographische Trennung des kalten Perchlorsäure-Extraktes erfolgte über PEI-Cellulose der Firma Merck, Darmstadt, nach PFLÜGER (37).
7. Die Messung der Einbauraten wurde in einer Szintillationslösung auf Dioxanbasis nach BRAY (32) vorgenommen.
8. Zur photometrischen Bestimmung von DNS, RNS und Protein-gehalt wurden folgende Reagentien verwendet:
 - a) Burton's Reagenz:

3 g Diphenylamin werden in 200 ml Eisessig und 3 ml konzent. H_2SO_4 gelöst.
 - b) Acetaldehyd-Stammlösung:

16 mg Acetaldehyd pro 1,0 ml Aq. dest. Von dieser Lösung werden 0,1 ml je 20 ml Burton's Reagenz zugesetzt.
 - c) Orcin-Reagenz:

100 mg $FeCl_3$ werden in 100 ml konzent. HCl gelöst und mit 3,5 ml einer 6 %igen Orcin-Lösung in reinem Alkohol versetzt.
 - d) Biuret-Reagenz:

9,0 g Kalium-Natrium-Tartrat und 3,0 g feinst pulverisiertes Kupfersulfat werden zunächst vollständig in 400 ml 0,2 n NaOH gelöst. Dann werden 5,0 g Kaliumjodid zugegeben und mit 0,2 n NaOH auf 1000 ml aufgefüllt.

B.II. Methoden

1. Synchronisationsverfahren zur Herstellung kleiner Zellen

Das hier angewendete Synchronisationsverfahren dauert etwa 90 min und stellt aus 100 g frischer Bäckerhefe 1000-1500 mg kleine Zellen mit einem Durchmesser von 3μ zur Verfügung: 100 g Bäckerhefe werden in 625 ml 0,9 %iger NaCl-Lösung suspendiert, auf 4 Zentrifugengläser verteilt und 2 min bei 250 x g zentrifugiert (Zentrifuge der Fa. Stock, Marburg).

Vom Überstand wird ca. 1 cm mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt, um Schmutzpartikel und Bakterien zu eliminieren. Der Bodensatz wird verworfen. Der restliche Überstand wird aufbewahrt und wieder auf 625 ml mit 0,9 %iger NaCl aufgefüllt, auf 4 Zentrifugengläser verteilt und 30 sec bei 250 x g, anschließend 30 sec bei 1000 x g zentrifugiert. Auch hier wird der Bodensatz verworfen, der Überstand mit 0,9 %iger NaCl auf 625 ml aufgefüllt und nochmals 2 min bei 250 x g zentrifugiert. Der Überstand A wird aufbewahrt, das Sediment wird mit 625 ml 0,9 %iger NaCl gut aufgerührt und 2 min bei 250 x g zentrifugiert. Dieser Überstand B wird mit dem Überstand A vereinigt, der Bodensatz wird verworfen. Die Überstände A und B werden dann 10 min bei 1700 x g zentrifugiert, der so gewonnene Überstand wird dekantiert und das Sediment wird, in etwas 0,9 %iger NaCl aufgerührt, über einen Filter mit Porengröße 3 μ abgesaugt. (Membranfilter der Firma Sartorius, Göttingen).

B.II. 2. Anordnung der Einbauversuche

- a) Um die Einbauhemmung unter der Einwirkung der oben genannten Substanzen eingehend in Bezug auf Wirkungsdauer, -eintritt und -stärke zu prüfen, wurde die Hefe unterschiedlichen Wachstumsbedingungen ausgesetzt:
 - α) Es wurden synchronisierte Zellen unter Zugabe der Vermehrungsstoffe Biotin, Vit. B₁ und B₆ von Anfang an wachsen lassen, d.h. unter "optimalen" Bedingungen.
 - β) In einer Variante dazu wurden der synchronisierten Hefe die Vitamine erst nach drei Stunden zugegeben.
 - γ) Bei der Verwendung unsynchronisierter Hefezellen bei Anwesenheit der Vermehrungsstoffe sollte sich herausstellen, ob und inwieweit unterschiedliche Wachstums- und Teilungsphasen der einzelnen Zellen Einfluß auf die Hemmwirkung der Substanzen nehmen.

b) Die 0,1 - 0,3 %igen Hefesuspensionen in der Nährlösung nach WILLIAMSON und SCOPES wurden im temperierten Wasserbad bei 30°C, unter ständigem Rühren auf dem Magnetrührer und guter Belüftung immer 6 Stunden wachsen lassen. Die beiden zu untersuchenden Substanzen wurden jeweils erst nach Abnahme des Ausgangswertes in 10^{-3} m Konzentration den Probeansätzen zugegeben, parallel dazu lief ein unbehandelter Kontrollansatz. Bei den Ansätzen mit synchronisierter Hefe unter Zusatz von Biotin, B_1 und B_6 wurde von Anfang an zum Vergleich auch das N,N-Dimethylhydrazin in 10^{-3} m Konzentration herangezogen.

Nach Abnahme des Ausgangswertes wurden weitere Proben (à 3 ml bzw. 5 ml) in 30 min oder 60-minütigen Zeitabständen abgenommen und 5 min mit 0,1 μ Ci L-(U- 14 C)-Leucin bzw. 5 μ Ci (6- 3 H)-Uracil in Zentrifugenröhrchen auf dem Magnetrührer inkubiert. Um die Markierungszeit gleichmäßig abubrechen, wurden die Proben nach Ablauf der 5 Minuten mit 5 ml eiskalter 0,9 %iger NaCl-Lösung verdünnt, und die Zentrifugenröhrchen im Eiswasser abgekühlt. Anschließend wurde die Nährlösung 5 min bei 3000 x g unter Kühlung abzentrifugiert und das Sediment mit 10 ml eiskalter NaCl-Lösung gewaschen, um kontaminierte Aktivität von den Hefezellwänden zu waschen.

B.II. 3. Hefezellaufschluß mit 6 %iger Perchlorsäure

Nach dem Waschen der Hefe wurde sofort mit 3 ml 6 %iger Perchlorsäure der Kaltextrakt zur Bestimmung der löslichen Nukleobausteine hergestellt, indem die Hefe 20 min mit der Perchlorsäure gerührt wird. Nach 10-minütigem Zentrifugieren bei 3000 x g befinden sich die löslichen Anteile im klaren Überstand. (Die Menge der $HClO_4$ kann je nach Bedarf an Kaltextrakt für verschiedene Bestimmungen variiert werden). Es hat sich gezeigt, daß diese Methode die sicherste

ist, um den Abbau hochmolekularer Substanzen zu vermeiden. Über einen vergleichenden Versuch, in dem die Hefe nach Abzentrifugieren der Nährlösung zunächst tiefgefroren aufbewahrt und zum Aufarbeiten wieder aufgetaut wurde oder auch nach Beendigung der Markierungszeit die Hefesuspension sofort mit der gleichen Menge 12 %iger eiskalter HClO_4 versetzt wurde, hat sich herausgestellt, daß der Kaltextrakt bei den letztgenannten Methoden einen höheren Nukleotidgehalt und höhere Aktivitätsraten aufwies, wogegen im hochmolekularen Bereich sowohl die optisch bestimmte Gesamtmenge als auch die Einbauraten niedriger ausfielen als bei der in den folgenden Versuchen hier verwendeten Methode, die wohl in Bezug auf die hochmolekularen Bestandteile als schonendste betrachtet werden konnte.

Nach Abnahme des Kaltextraktes wurde die Hefe für RNS- und DNS-Bestimmungen 20 Minuten bei 100°C mit 6 %iger Perchlorsäure hydrolysiert, wobei die Perchlorsäuremenge wieder je nach Bedarf zwischen 2 ml und 5 ml gewählt werden kann. Nach Abkühlen wurden die Proben 10 Minuten bei $3000 \times g$ zentrifugiert, im Überstand befand sich die RNS- bzw. DNS-haltige Substanz.

Für Proteinbestimmungen hat sich eine Hydrolysedauer von 15 Minuten als günstig herausgestellt. Nach Abzentrifugieren und Absaugen des Überstandes wurde das Sediment durch 30-minütiges Rühren mit 3 ml 0,1 n NaOH in Lösung gebracht.

B.II. 4. Methoden zur Trennung von RNS und DNS

Um allein die hochmolekulare DNS unter gleichzeitiger Eliminierung der RNS aus Hefezellen zu extrahieren, stehen zwei in der Literatur beschriebene Verfahren zur Verfügung (33, 34):

- a) Nach Herstellen und Absaugen des kalten Perchlorsäure-Extraktes wird die Hefe mit 3 ml 1 n NaOH 30 min im

temperierten Wasserbad bei 37°C auf dem Magnetrührer gerührt, anschließend werden die Proben 5 min bei $3000 \times g$ zentrifugiert. Vom Überstand werden 2 ml in Zentrifugenröhrchen im Eisbad abgekühlt und mit 2,0 ml eiskalter 12 %iger Perchlorsäure versetzt. Es wird nochmals 10 Minuten bei $3000 \times g$ zentrifugiert, der Überstand wird vorsichtig dekantiert und das Sediment mit 3,0 ml 6 %iger Perchlorsäure 20 Minuten bei 100°C hydrolysiert. Nach Zentrifugieren soll der Überstand nur noch DNS und keine RNS mehr enthalten. (Methode nach BURTON).

- b) Hier wird nach Herstellung und Absaugen des Kaltextraktes das Sediment mit 2,5 ml 1 n KOH 18 Stunden bei 37°C im Trockenschrank inkubiert. Anschließend wird bei $3000 \times g$ 10 min zentrifugiert, 2,0 ml vom Überstand werden mit 2,0 ml 15 %iger HClO_4 versetzt und ebenfalls bei $3000 \times g$ 10 min zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt, das Sediment mit 3 ml 6 %iger HClO_4 aufgerührt und zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wird das Sediment 20 min mit 3 ml 6 %iger Perchlorsäure bei 100°C hydrolysiert. Das so gewonnene Hydrolysat soll ebenfalls keine RNS mehr enthalten.

B.II. 5. Methoden zur optischen Bestimmung der löslichen Nukleobausteine, DNS, RNS und Proteine

- a) Um die säurelöslichen Nukleobausteine mengenmäßig zu bestimmen, wurde der kalte Perchlorsäureextrakt bei 260 nm im UV gegen den Leerwert Aq.dest in 1 cm QS-Küvetten gemessen. (Zeiss-Photometer PMQ II).
- b) Die Bestimmung der DNS-Menge wurde nach BURTON (35) durchgeführt: 0,5 ml des DNS-haltigen Hydrolysates wurden mit 1,0 ml Burton's Reagenz + Acetaldehyd versetzt und 18 Std. bei 30°C im Trockenschrank inkubiert. Danach erfolgte die Messung der Extinktion bei 578 nm gegen den Leerwert

Perchlorsäure + Burton's Reagenz (Acetaldehyd im Eppendorf-Photometer. (Eichwert: $E = 0,1 = 6,7 \gamma \text{ DNS/ml}$)).

- c) Zur Ermittlung der RNS-Menge (nach BARRENSHEEN und PEHAM) wurden 0,2 ml des Hydrolysates mit 0,8 ml 6 %iger Perchlorsäure verdünnt und mit 2,0 ml Orcin-Reagenz versetzt. Dieser Ansatz wurde 20 Minuten bei 80°C im Wasserbad inkubiert, anschließend im Eisbad sofort abgekühlt. Die Extinktion wurde bei 665 nm gegen den Leerwert Perchlorsäure + Orcin-Reagenz im Zeiss-Photometer PMQ II gemessen. Eichwert: $E = 0,1 = 12,5 \gamma \text{ RNS/ml}$.
- d) Der Proteingehalt wurde nach WEICHSELHAMM, mod. nach BÜCHNER ermittelt. Nach 30-minütigem Rühren wurden von der proteinhaltigen NaOH-Suspension 0,5 ml mit 1,0 ml Biuret-Reagenz versetzt, nochmals 30 Minuten gerührt und anschließend zentrifugiert. Die Extinktion wurde bei 546 nm gegen den Leerwert 0,1 n NaOH-Lösung + Biuret-Reagenz im Eppendorf-Photometer gemessen. Eichwert: $E = 0,1 = 4,15 \text{ mg Protein/ml}$.

B.II. 6. Analyse des kalten Perchlorsäureextraktes durch chromatographische Auftrennung mit Hilfe einer PEI-Cellulosesäule nach PFLÜGER (36)

- a) Versuchsanordnung und Gewinnung des kalten Perchlorsäureextraktes:

Zur Trennung der löslichen Nukleobausteine muß eine Mindesthefemenge von 200 mg zur Verfügung stehen, damit sich die Peaks deutlich von der Grundextinktion abheben. Es wurden 2 Ansätze à 200 ml einer 0,1 %igen synchronisierten Hefezellsuspension im temperierten Wasserbad bei 30°C unter ständigem Rühren, Belüftung und Vitaminzusatz 2 Stunden wachsen lassen. Die 3 Probeansätze, neben einem

unbehandelten Kontrollansatz, enthielten in 10^{-3} molarer Konzentration die Hemmsubstanzen "Hydrazin", "Hydrazon" und N,N-Dimethylhydrazin. Nach zwei Stunden wurden von jedem Ansatz 150 ml unter kräftigem Rühren und Belüften 5 Minuten mit je 250 μ Ci Uracil inkubiert. Nach der Markierungszeit wurden die Metallzentrifugenbecher im Eisbad abgekühlt und die Hefesuspension mit 50 ml eiskalter 0,9 %iger Kochsalzlösung versetzt. Nach Abzentrifugieren der Nährlösung wurde die Hefe mit je 50 ml eiskalter 0,9 %iger NaCl-Lösung nachgewaschen. Anschließend wurden die löslichen Precursor durch 20-minütiges Rühren mit 10 ml eiskalter 6 %iger Perchlorsäure extrahiert. Der Kaltextrakt wurde sofort mit KOH-Lösung auf pH 6.7 - 7.0 eingestellt. Die Zellrückstände und das ausgefallene Kaliumperchlorat wurden abzentrifugiert und der klare Überstand gefriergetrocknet.

b) Anfertigung der PEI-Cellulose-Säulen:

50 g PEI-Cellulose wurden in 300 ml einmolarer Kochsalzlösung suspendiert und kräftig aufgerührt. Nach Absetzen der Cellulose wurde der trübe Überstand abgesaugt. Nach viermaliger Wiederholung dieses Waschvorganges wurde die Zellulosesuspension entgast und in Glassäulen von 240 mm Länge und 9 mm innerem Durchmesser gefüllt. Nach Absetzen der Cellulose-Partikel wurde die überstehende Kochsalzlösung abtropfen lassen und die Cellulose mit ca. 50 ml dest. Wasser nachgewaschen. Anschließend wurde der Rückstand des gefriergetrockneten, kalten Perchlorsäureextraktes in 3,0 ml Aq. bidest gelöst und auf die Säule aufgetragen.

c) Auftrennung des kalten Perchlorsäureextraktes:

Mit Aq.bidest, das mit einem Flow von 16 ml/h über die Säule gepumpt wurde, konnten zunächst die Nukleobasen

eluiert werden. Nach etwa 3 Stunden wurde der NaCl-Gradient angeschlossen, indem 4 m Kochsalzlösung mit einem Flow von 4 ml/h in ein Gradientenmischgefäß mit 250 ml Aq. bidest gepumpt und die Gradientenlösung mit einem Flow von 16 ml/h über die Säule geführt wurde. Die Extinktion des Eluats wurde fortlaufend mit einem LKB Uvicord bei 260 nm gemessen und registriert; das Eluat selbst wurde zu Fraktionen von je 2,5 ml im LKB-Radi-Rac gesammelt. Maximal 140 Fraktionen wurden aufgefangen.

B.II. 7. Aktivitätsmessungen

Zur Bestimmung der Einbauraten wurden vom hochmolekularen Protein nach Extraktion mit 0,1 n Natronlauge und Abzentrifugieren der Zellrückstände 1 ml des klaren Überstandes mit 10 ml Bray'scher Lösung versetzt und im Scintillationszähler N.C. Mark II gemessen.

Vom säulenchromatographisch getrennten kalten Perchlorsäureextrakt wurde jeweils von 2,5 ml Eluat 1 ml zur Aktivitätsmessung eingesetzt. Jeweils 1 ml der HClO_4 -Kaltextrakte und Hydrolysate bei den Wachstumsversuchen wurden mit 2,0 ml 6 %iger Kalilauge neutralisiert. Nach Abzentrifugieren der Zellrückstände wurde jeweils 1 ml des klaren Überstandes für die Aktivitätsmessung im N.C. Mark II eingesetzt. Die ausgedruckten cpm-Werte wurden auf dpm-Werte umgerechnet, indem sie, gemäß der jeweils eingesetzten Menge, mit folgenden Faktoren multipliziert wurden:

- a) $F = 9,0$ für den kalten Perchlorsäureextrakt und das HClO_4 -Hydrolysat bei den Wachstumsversuchen.
- b) $F = 2,5$ für den säulenchromatographisch getrennten Perchlorsäureextrakt.
- c) $F = 3$ für den NaOH-Proteinextrakt.

B.II. 8. Auswertung der Ergebnisse

a) Wachstum - Einbauversuche:

Die Einbauraten von Uracil und Leucin wurden für den kalten Perchlorsäureextrakt und für den hochmolekularen Bereich, d.h. RNS und Protein, wie folgt errechnet: Die Ausgangswerte sowohl der Kontrollansätze als auch die der mit den Hemmsubstanzen inkubierten Probean-sätze wurden jeweils gleich 1 gesetzt und die folgen-den dpm-Werte für jeden Zeitpunkt in Faktoren, bezogen auf den Ausgangswert, umgerechnet. Um die Einbauraten unter dem Einfluß der Hemmsubstanzen in Prozent gegenüber der Kontrolle ausdrücken zu können, wurden die einzelnen Fak-toren der Kontroll-dpm-Werte zu jedem Zeitpunkt als 100 % angenommen und auf die entsprechenden Faktoren der Pro-ben-dpm-Werte bezogen.

Die Werte für die Gesamtaktivität setzen sich aus den Einbauraten im kalten HClO_4 -Extrakt und die in RNS bzw. Proteine zusammen. Auch hier wurden die absoluten Zahlen in Faktoren umgerechnet und die Proben gegenüber der Kon-trolle in Prozent ausgedrückt. Die spezifische Aktivität soll die in die Zelle eingebaute Aktivität auf den ent-sprechenden Gehalt an RNS bzw. Proteinen beziehen. Durch Division der absoluten Einbauraten durch die dazugehöri-gen Extinktionen wurden die relativen Werte für die spe-zifische Aktivität ermittelt und über die Faktorenumrech-nung in Prozent angegeben. Um die absoluten Zahlenwerte klein zu halten, wurden die gemessenen Extinktionen mit 10^3 multipliziert.

b) Säulenchromatographische Trennung:

Zunächst wurde von jeder Fraktion die Extinktion bei 260 nm gemessen und die entsprechende Aktivität ermittelt. Die Aktivitäten in dem Uracil/Uridin-, UMP, UDP- und UTP-Peak wurden durch Addition der dpm-Werte der zu einem

entsprechenden Peak gehörigen Fraktionen gefunden. Diese vier Einbauraten wurden, für jeden Ansatz gesondert, in ihrem Verhältnis zueinander prozentual ausgedrückt, wobei die jeweilige Summe der vier "Aktivitäts-Peaks" als 100 % angenommen wurde. Um die abweichende Verteilung der Aktivitäten unter dem Einfluß der Hemmsubstanzen deutlich zu machen, wurden die einzelnen Werte der Proben prozentual zu den entsprechenden Kontrollwerten ausgedrückt.

C. E R G E B N I S S E

I. Uracil-Einbaustudium in wachsenden Hefezellen unter verschiedenen Wachstumsbedingungen

1. Uracil-Einbau in synchronisierte Hefezellen unter Vermehrungsbedingungen

Der Uracil-Einbau in synchronisierte Hefezellen, die unter Zufuhr von Biotin, Vitamin B₁ und Vitamin B₆ von Anfang an über einen Zeitraum von 3 Stunden wachsen und mit den Hemmsubstanzen "Hydrazin", "Hydrazon" und N,N-Dimethylhydrazin in jeweils 10^{-3} molarer Konzentration behandelt werden, ergab folgende Ergebnisse:

a) Uracil-Einbau unter dem Einfluß von "Hydrazin":

Die Einbauraten in den Kaltextrakt zeigen in der ersten halben Stunde keinen Einfluß der Hemmsubstanz; erst 1 Stunde nach der Inkubation macht sich ein leichter Rückgang bemerkbar, der sich bis zu 3 Stunden kontinuierlich fortsetzt und zum Meßzeitpunkt 3 h sein Maximum mit 42 % des Kontrollwertes erreicht. Im hochmolekularen Bereich ist bereits nach der 30. Versuchsminute ein leichter Abfall der Einbauraten zu erkennen; innerhalb der folgenden 2 Stunden sinkt die gemessene Aktivität rapide auf einen Minimalwert von 23 % ab.

Der Einfluß des "Hydrazin" macht sich während der ersten 30 Minuten, was die gesamte Aktivitätsaufnahme betrifft, nicht bemerkbar. Erst nach 1 Stunde ist ein starker Rückgang der Aufnahmeraten festzustellen, der mit 37 % des Kontrollwertes zum Zeitpunkt 3 h sein Maximum erreicht. Die spezifische Aktivität soll zusätzlich eine Aussage über die mengenmäßige Entwicklung von RNS, d.h. das Zellwachstum, machen. Die Werte sollen klären, ob der Rückgang der Einbauraten in die RNS nur auf einem entsprechend gehemmten Wachstum beruht.

Aus den Werten der spezifischen Aktivität ergibt sich, daß während der ersten halben Stunde ein hemmender Einfluß weder auf den Uracil-Einbau noch auf die RNS-Synthese besteht. Erst nach 1 Stunde setzt ein kontinuierlicher Abfall der spezifischen Aktivität ein, der sein Maximum nach 2 Stunden erreicht. (Vgl. Tabelle 1 a-d; Abb. 1).

Tab. 1a: (6-³H)-Uracil-Einbauraten in den kalten HClO₄-Extrakt

t/h	Kontrolle	Probe	Probe:Kontrolle
	14.211	11.919	
0	= 1,00	= 1,00	100 %
0,5	1,49	1,72	115 %
1	2,75	2,45	89 %
1,5	3,32	2,60	78 %
2	3,35	2,14	64 %
2,5	3,55	2,20	62 %
3	4,87	2,03	42 %

Tab. 1b: (6-³H)-Uracil-Einbauraten in die RNS

t/h	Kontrolle	Probe	Probe:Kontrolle
	6.000	5.004	
0	= 1,00	= 1,00	100 %
0,5	6,10	5,85	96 %
1	8,58	6,45	75 %
1,5	6,26	2,70	43 %
2	6,54	2,86	44 %
2,5	9,63	2,24	23 %
3	6,48	1,78	28 %

Tab. 1c: (6-³H)-Uracil-Gesamteinbauraten

t/h	Kontrolle	Probe	Probe:Kontrolle
	20.211	16.923	
0	= 1,00	= 1,00	100 %
0,5	2,86	2,94	103 %
1	4,48	3,64	81 %
1,5	4,19	2,63	63 %
2	4,30	2,36	55 %
2,5	5,35	2,21	41 %
3	5,35	1,96	37 %

Tab. 1d: Spezifische Aktivität für die RNS

t/h	Kontrolle	Probe	Probe:Kontrolle
	66	50	
0	= 1,00	= 1,00	100 %
0,5	7,82	8,02	103 %
1	7,42	6,86	92 %
1,5	4,67	2,30	49 %
2	3,55	1,42	40 %
2,5	6,08	2,55	42 %
3	3,02	1,27	42 %

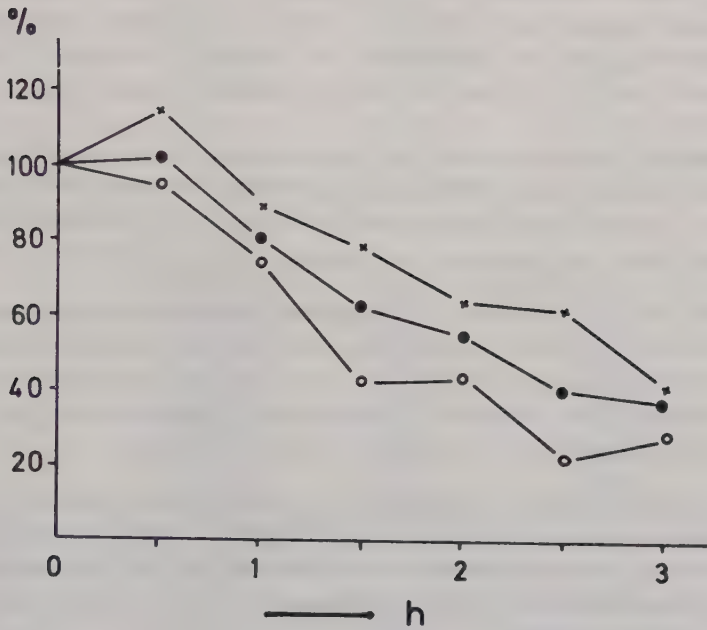


Abb. 1: Einbau von (6-³H)-Uracil in synchron wachsender Hefe unter Vermehrungsbedingungen unter dem Einfluß von 10⁻³ Mol/Ltr. "Hydrazin"
(x — x : HClO₄-Extrakt; o — o : RNS;
• — •: Gesamtaufnahme)

b) Uracil-Einbau unter dem Einfluß des "Hydrazon":

Die Uracilaufnahme in den Zellpool wird sofort stark gehemmt: schon zum Zeitpunkt 1 h ist ein Rückgang der Einbauraten auf 40 % gegenüber der Kontrolle erreicht, der sich bis zur dritten Versuchsstunde auf diesem Minimum hält.

Ähnlich verhalten sich die Einbauraten in die RNS. Hier ist bereits nach 30 Minuten der maximale Hemmeffekt nahezu erreicht. Vom Zeitpunkt 0,5 h bis 2,5 h halten sich die Werte auf einem Level zwischen 20 % und 13 %.

Bei der Betrachtung der insgesamt aufgenommenen Aktivität kann ebenfalls gesagt werden, daß die maximale Einbauhemmung nach 1 Stunde mit einer Einbaurrate von 25 % gegenüber der Kontrolle erreicht ist, sich während der folgenden zwei Stunden nicht weiter steigert.

Die spezifischen Aktivitäten für den hochmolekularen Bereich zeigen ebenfalls einen steilen Abfall der Werte in den ersten 30 Minuten, die bis zur dritten Stunde in etwa unverändert bleiben. (Vgl. Tab. 2 a - d; Abb. 2).

c) Uracil-Einbau unter dem Einfluß des N,N-Dimethylhydrazin:

Eine Uracil-Einbauhemmung in den Zellpool macht sich innerhalb von 3 Stunden nicht bemerkbar. Beim Uracil-Einbau in die RNS lassen sich zwei Phasen der Hemmung beobachten. Innerhalb der ersten Stunde sinken die Einbauraten auf 46 % ab. Dann folgt ein steiler Anstieg, der bis zum Zeitpunkt 2,5 h in einem Wert von 127 % gipfelt und danach wieder abfällt.

Tab. 2a: ($6\text{-}^3\text{H}$)-Uracil-Einbauraten in den kalten HClO_4 -Extrakt.

t/h	Kontrolle	Probe	Probe:Kontrolle
	14.211	12.825	
0	= 1,00	= 1,00	100 %
0,5	1,49	1,26	85 %
1	2,75	1,10	40 %
1,5	3,32	1,27	38 %
2	3,35	1,31	39 %
2,5	3,55	1,32	37 %
3	4,87	1,21	25 %

Tab. 2b: ($6\text{-}^3\text{H}$)-Uracil-Einbauraten in die RNS

t/h	Kontrolle	Probe	Probe:Kontrolle
	6.000	4.821	
0	= 1,00	= 1,00	100 %
0,5	6,10	1,21	20 %
1	8,58	1,20	14 %
1,5	6,26	1,05	17 %
2	6,54	0,86	13 %
2,5	9,63	1,23	13 %
3	6,48	1,42	23 %

Tab. 2c: ($6\text{-}^3\text{H}$)-Uracil-Gesamteinbauraten

t/h	Kontrolle	Probe	Probe:Kontrolle
	20.211	17.646	
0	= 1,00	= 1,00	100 %
0,5	2,86	1,24	43 %
1	4,48	1,13	25 %
1,5	4,19	1,21	29 %
2	4,30	1,18	27 %
2,5	5,35	1,29	24 %
3	5,35	1,25	23 %

Tab. 2d: Spezifische Aktivität für die RNS

t/h	Kontrolle	Probe	Probe:Kontrolle
	66	46	
0	= 1,00	= 1,00	100 %
0,5	7,82	1,30	17 %
1	7,42	1,13	15 %
1,5	4,67	0,78	17 %
2	3,55	0,65	18 %
2,5	6,08	0,93	15 %
3	3,02	1,02	34 %

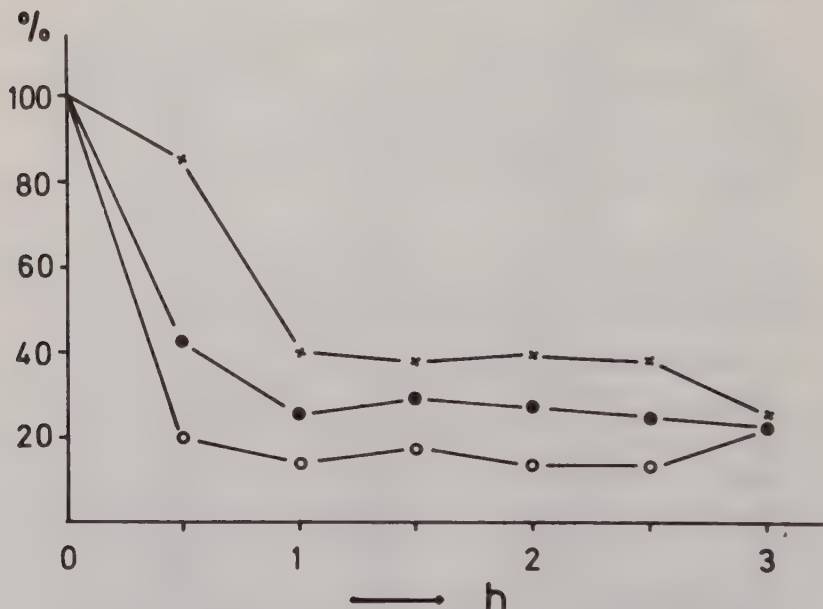


Abb. 2: Einbau von (6-³H)-Uracil in synchron wachsender Hefe unter Vermehrungsbedingungen unter dem Einfluß von 10⁻³ Mol/Ltr. "Hydrazon". (x — x : HClO₄-Extrakt; o — o : RNS; • — • : Gesamtaufnahme).

Während der ersten Stunde wird die Gesamtaufnahme an Uracil nur geringfügig negativ beeinflusst. Dann kommt es auch hier, analog den RNS-Einbauraten, zu einem Anstieg über 100 % bis zum Zeitpunkt 2,5 h nach Versuchsbeginn.

Die spezifische Aktivität für die RNS zeigt in der ersten halben Stunde mehr oder weniger allein auf Grund der Einbauhemmung einen starken Abfall. Auf gleiche Weise läßt sich auch das Anwachsen der Werte bis zum Zeitpunkt 2,5 h erklären. (Vgl. Tab. 3a - d; Abb. 3).

Tab. 3a: (6-³H)-Uracil-Einbauraten in den kalten HClO₄-Extrakt

t/h	Kontrolle	Probe	Probe:Kontrolle
	39.480	31.350	
0	= 1,00	= 1,00	100 %
0,5	7,47	8,38	112 %
1	14,24	16,62	117 %
1,5	17,50	18,11	103 %
2	21,22	21,95	102 %
2,5	24,31	26,87	111 %
3	22,36	24,87	111 %

Tab. 3b: (6-³H)-Uracil-Einbauraten in die RNS

t/h	Kontrolle	Probe	Probe:Kontrolle
	6.540	5.340	
0	= 1,00	= 1,00	100 %
0,5	31,16	14,24	46 %
1	60,88	33,10	54 %
1,5	46,36	44,09	95 %
2	60,44	59,80	99 %
2,5	62,37	101,67	127 %
3	128,10	83,35	65 %

Tab. 3c: (6-³H)-Uracil-Gesamteinbauraten

	46.020	36.690	
0	= 1,00	= 1,00	100 %
0,5	10,83	9,23	85 %
1	20,87	19,02	91 %
1,5	21,60	21,89	101 %
2	26,72	27,11	101 %
2,5	29,72	37,73	127 %
3	37,39	33,38	89 %

Tab. 3d: Spezifische Aktivität für die RNS

t/h	Kontrolle	Probe	Probe:Kontrolle
	69	61	
0	= 1,00	= 1,00	100 %
0,5	25,46	13,26	52 %
1	36,29	24,34	67 %
1,5	28,54	26,98	95 %
2	23,10	28,15	122 %
2,5	24,23	34,36	142 %
3	30,81	22,05	72 %

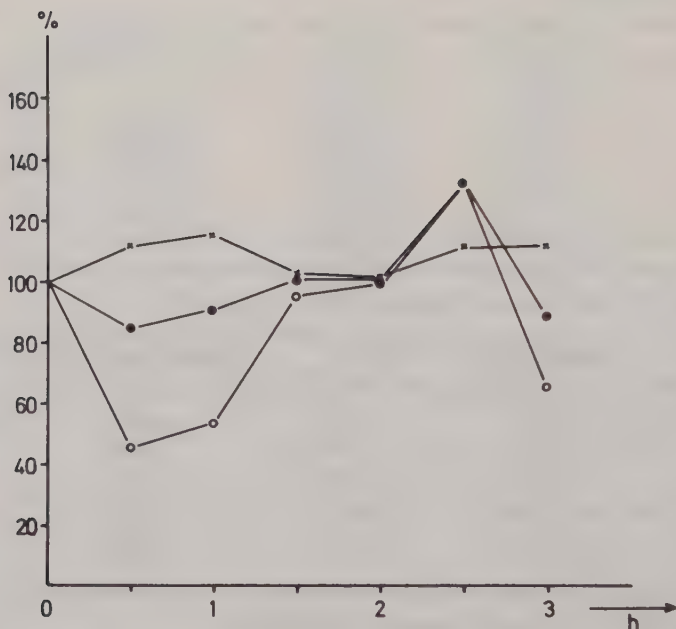


Abb. 3: Einbau von (6-³H)-Uracil in synchron wachsender Hefe unter Vermehrungsbedingungen unter dem Einfluß von 10⁻³ Mol/Ltr. N,N-Dimethylhydrazin. (x — x : HC1O₄-Extrakt; o — o : RNS; • — • : Gesamtaufnahme)

C.I. 2. Uracil-Einbau in synchronisierte Hefezellen unter Zusatz der Vermehrungsstoffe nach drei Stunden

a) Uracil-Einbau unter dem Einfluß von "Hydrazin":

Eine deutliche Hemmung der Aktivitätsaufnahme in den Kalt-extrakt tritt erst nach 2 Stunden auf. Die Hemmrage wird nach Zugabe der Vermehrungsstoffe noch vergrößert, da die Kontrolle einen wesentlich höheren Wachstumsimpuls als die Probe erfährt.

Dies macht sich auch im hochmolekularen Bereich bemerkbar. Hier kommt es in den ersten 3 Stunden nur zu einer mäßigen Hemmung der RNS-Synthese. Jedoch schon 30 Minuten nach der Vitaminzugabe sinkt die Einbaurrate schlagartig auf 27 % der Kontrolle ab. Diese Hemmquote bleibt dann bis zu Versuchsende nahezu konstant.

Diese Aussagen treffen in gleicher Weise für Gesamtaufnahme an Uracil zu. (Vgl. Tab. 4 a - c; Abb. 4).

Tab. 4a: ($6\text{-}^3\text{H}$)-Uracil-Einbauraten in den kalten HClO_4 -Extrakt

	t/h	Kontrolle	Probe	Probe:Kontrolle
		2.040	1974	
	0	= 1,00	= 1,00	100 %
	1	4,12	3,87	94 %
	1,5	3,35	2,94	88 %
	2	3,15	3,13	99 %
	2,5	3,62	2,61	72 %
Biotin →	3	3,48	2,49	72 %
Vit. B ₁ ,	3,5	5,34	2,31	43 %
B ₆	4	9,02	4,18	46 %
	4,5	15,31	5,69	37 %
	5	16,87	6,24	37 %
	6	14,53	4,31	30 %

Tab. 4b: ($6\text{-}^3\text{H}$)-Uracil-Einbauraten in die RNS

	t/h	Kontrolle	Probe	Probe:Kontrolle
		1.155	1.224	
	0	= 1,00	= 1,00	100 %
	1	2,20	2,05	93 %
	1,5	2,31	1,85	80 %
	2	2,25	1,48	66 %
	2,5	3,50	2,32	68 %
Biotin →	3	3,02	2,03	67 %
Vit. B ₁ ,	3,5	8,72	2,35	27 %
B ₆	4	7,23	3,04	42 %
	4,5	7,52	3,18	42 %
	5	14,20	4,11	29 %
	6	21,36	6,42	30 %

Tab. 4c: (6-³H)-Uracil-Gesamteinbauraten

t/h	Kontrolle	Probe	Probe:Kontrolle
	3.195	3.198	
0	= 1,00	= 1,00	100 %
1	3,37	3,17	94 %
1,5	2,97	2,52	85 %
2	2,82	2,50	89 %
2,5	3,94	2,72	69 %
3	3,31	2,32	70 %
3,5	6,56	2,39	36 %
4	7,52	3,75	50 %
4,5	12,50	4,73	38 %
5	15,90	5,23	33 %
6	17,00	5,12	30 %

Biotin
Vit. B₁ →
B₆

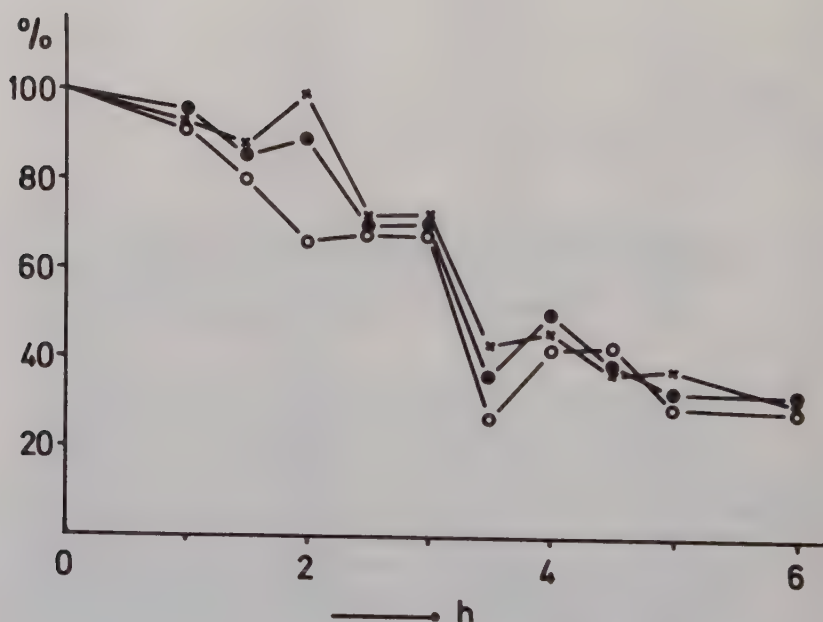


Abb. 4: Einbau von (6-³H)-Uracil in synchron wachsender Hefe bei Zugabe der Vermehrungsfaktoren nach 3 Stunden (↑) unter dem Einfluß von 10⁻³ Mol/Ltr. "Hydrazin". (x — x : HClO₄-Extrakt; o — o : RNS; • — • : Gesamtaufnahme).

b) Uracileinbau unter dem Einfluß von "Hydrazon":

Beim "Hydrazon" wird im Gegensatz zum "Hydrazin" die Aktivitätsaufnahme in den Kaltextrakt sehr rasch vermindert (71 % der Kontrolle nach 1 Stunde). Nach 3-stündigem Wachstum erreicht die Hemmung einen Wert von 45 % der Kontrolle. Die Einbaurrate wird nach Vitaminzugabe innerhalb von 30 Minuten auf 27 % verringert, was mit der steigenden Aktivitätsaufnahme der Kontrolle zu erklären ist.

Im hochmolekularen Bereich ist der Hemmvorgang ähnlich dem im niedermolekularen Zellanteil, nur kommt es hier zu einer noch stärkeren Synthesehemmung. Für die Gesamtaufnahme an Uracil gilt das oben Gesagte: die Aufnahmehemmung macht sich schon während der ersten 3 Versuchsstunden deutlich, um sich nach der Vitaminzugabe nochmals stärker auszuprägen. (Vgl. Tab. 5 a - c; Abb. 5).

Tab. 5 a: (6-³H)-Uracil-Einbauraten in den kalten HClO₄-Extrakt

t/h	Kontrolle	Probe	Probe:Kontrolle
	2.040	1.881	
0	= 1,00	= 1,00	100 %
1	4,12	2,93	71 %
1,5	3,35	2,04	61 %
2	3,15	1,70	54 %
2,5	3,62	1,50	41 %
Biotin → 3	3,48	1,56	45 %
Vit.B ₁ → 3,5	5,34	1,43	27 %
B ₆ 4	9,02	2,20	24 %
4,5	15,31	3,35	22 %
5	16,87	4,20	25 %
6	14,53	5,43	37 %

Tab. 5b: (6-³H)-Uracil-Einbauraten in die RNS

t/h	Kontrolle	Probe	Probe:Kontrolle
	1.155	1.401	
0	= 1,00	= 1,00	100 %
1	2,20	1,08	53 %
1,5	2,31	0,97	42 %
2	2,25	0,69	31 %
2,5	3,50	0,67	19 %
Biotin → 3	3,02	0,76	25 %
Vit.B ₁ → 3,5	8,72	0,93	11 %
B ₆ 4	7,23	1,47	20 %
4,5	7,52	1,61	21 %
5	14,20	2,83	20 %
6	21,36	6,60	31 %

Tab. 5c: (6-³H)-Uracil-Gesamteinbauraten

t/h	Kontrolle	Probe	Probe:Kontrolle
	3.195	3.282	
0	= 1,00	= 1,00	100 %
1	3,37	1,85	55 %
1,5	2,97	1,58	53 %
2	2,82	1,27	45 %
2,5	3,94	1,15	29 %
Biotin → 3	3,31	0,86	26 %
Vit.B ₁ → 3,5	6,56	1,21	18 %
B ₆ 4	7,52	1,89	25 %
4,5	12,50	2,61	21 %
5	15,90	3,61	23 %
6	17,00	5,93	35 %

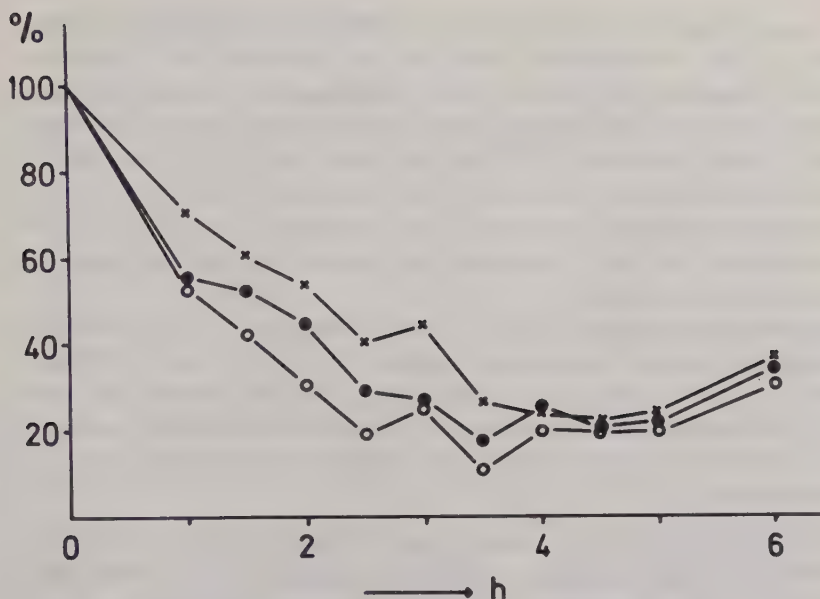


Abb. 5: Einbau von (6-³H)-Uracil in synchron wachsender Hefe bei Zugabe der Vermehrungsfaktoren nach 3 Stunden (↑) unter dem Einfluß von 10⁻³ Mol/Ltr. "Hydrazon". (x — x : HClO₄-Extrakt; o — o : RNS; • — • : Gesamtaufnahme).

C.I. 3. Uracileinbau in unsynchronisierte Hefezellen

Unsynchronisierte Hefezellen zeigen unter optimalen Wachstumsbedingungen nach sechs Stunden ein Ansteigen der Nukleotidmenge auf das Siebenfache des Anfangswertes und eine RNS-Vermehrung um das Zehnfache.

a) Uracil-Einbau unter dem Einfluß von "Hydrazin":

Die Substanz bewirkt bereits nach eineinhalb Stunden eine deutliche Nukleotidsynthesehemmung; die Zellen haben nach sechsständigem Wachstum ihre Anfangsmenge nur vervierfacht.

Zum gleichen Zeitpunkt wird die RNS-Synthese gehemmt; nach Ablauf der Versuchszeit wird nur das Dreifache des anfänglichen RNS-Gehaltes erzielt. Die Aufnahmeraten im Nukleotid-Pool steigen während der ersten Stunde steil bis auf 146 % des Vergleichswertes an. Die gemessene Aktivität geht dann zwar zurück, liegt aber beim Zeitpunkt 2,5 h immer noch bei der Norm. Während der restlichen Versuchszeit ist ein starker Abfall auf 27 % gegenüber der Kontrolle zum Zeitpunkt 6 h zu verzeichnen.

Die RNS-Einbauraten zeigen dagegen einen sofortigen Rückgang, nach der ersten Stunde sind bereits 49 % erreicht. Die Hemmung verläuft dann etwas langsamer, bis die Einbauraten nach 4 Stunden auf 15 % abgesunken sind, um sich während der beiden letzten Versuchsstunden dem Endwert von nur mehr 8 % anzunähern.

Die Gesamteinbauraten lassen bis zu einer Stunde noch keine Abnahme erkennen. Danach erfolgt auch hier in den nächsten drei Versuchsstunden ein rapider Rückgang auf 26 % des Kontrollwertes. Die maximale Hemmung wird bei Versuchsende mit einer Einbaurrate von 17 % erreicht.

Die spezifische Aktivität für die RNS fällt zunächst auf Grund der Einbauraten bis auf 48 % ab. Während der ersten eineinhalb Stunden bleibt die RNS-Entwicklung noch unbeeinträchtigt; erst dann wird die Synthese stark verzögert, was sich in dem Rückgang der Werte auf nur 29 % gegenüber 18 % der Einbaurrate ausdrückt.

(Vgl. Tab. 6a - d; Abb. 6).

Tab. 6a: (6-³H)-Uracil-Einbauraten in den kalten HClO₄-Extrakt

t/h	Kontrolle	Probe	Probe:Kontrolle
	10.800	9.000	
0	= 1,00	= 1,00	100 %
0,5	1,22	1,48	121 %
1	1,51	2,20	146 %
1,5	1,11	1,20	108 %
2	1,27	1,39	109 %
2,5	1,78	2,02	113 %
3	1,21	0,96	79 %
4	3,06	0,95	31 %
5	1,93	0,71	37 %
6	3,15	0,84	27 %

Tab. 6b: (6-³H)-Uracil-Einbauraten in die RNS

t/h	Kontrolle	Probe	Probe:Kontrolle
	7.200	7.800	
0	= 1,00	= 1,00	100 %
0,5	2,04	1,75	73 %
1	1,61	0,79	49 %
1,5	2,42	1,02	42 %
2	2,03	1,11	55 %
2,5	2,12	0,63	30 %
3	3,31	1,27	38 %
4	2,78	0,55	15 %
5	4,05	0,51	13 %
6	4,23	0,34	8 %

Tab. 6c: (6-³H)-Uracil-Gesamteinbauraten

t/h	Kontrolle	Probe	Probe:Kontrolle
	18.000	16.800	
0	= 1,00	= 1,00	100 %
0,5	1,55	1,61	104 %
1	1,55	1,54	99 %
1,5	1,63	1,12	69 %
2	1,57	1,26	80 %
2,5	1,92	1,38	72 %
3	2,05	1,10	54 %
4	2,95	0,76	26 %
5	2,78	0,61	22 %
6	3,58	0,61	17 %

Tab. 6 d: Spezifische Aktivität für die RNS

t/h	Kontrolle	Probe	Probe:Kontrolle
	74	75	
0	= 1,00	= 1,00	100 %
0,5	1,57	1,35	86 %
1	1,15	0,55	48 %
1,5	1,01	0,53	52 %
2	0,80	0,60	75 %
2,5	0,57	0,28	49 %
3	0,69	0,53	77 %
4	0,43	0,20	47 %
5	0,49	0,17	35 %
6	0,41	0,12	29 %

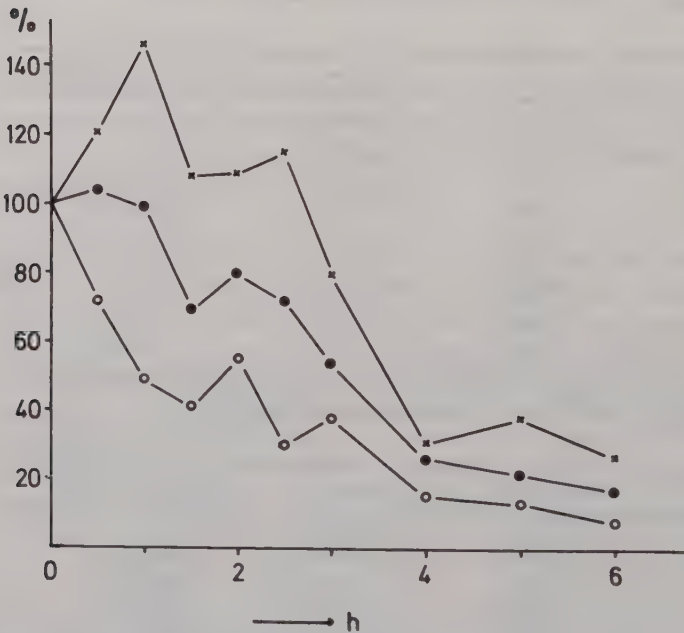


Abb. 6: Einbau von (6-³H)-Uracil in asynchron wachsender Hefe unter Vermehrungsbedingungen unter dem Einfluß von 10⁻³ Mol/Ltr. "Hydrazin". (x — x : HClO₄-Extrakt; o — o : RNS; • — • : Gesamtaufnahme).

b) Uracil-Einbau unter dem Einfluß von "Hydrazon":

Nach zwei Stunden wirkt sich eine Synthesehemmung auf die Nukleotide aus. Die anfangs noch ganz normal ablaufende Vermehrung wird in der zweiten Versuchshälfte stark gebremst. Am Ende der sechsstündigen Versuchsdauer wird nur eine Verdreifachung der Ausgangs-Nukleotidmenge erreicht.

Die RNS-Synthese ist bereits nach einer Stunde deutlich beeinträchtigt. Die RNS-Ausgangsmenge wird innerhalb von 6 Stunden unter dem Einfluß dieser Substanz nur verdreifacht.

Das β -Chloräthylbenzaldehyd-hydrazon bewirkt bei unsynchronisierten Hefezellen, im Gegensatz zu synchronisierten Hefezellen, zunächst einen steilen Anstieg der Nukleotid-Einbauraten auf 135 % nach 30 Minuten. Erst dann macht sich auch hier eine rasche Verminderung der Einbauraten bemerkbar, die nach insgesamt vier Stunden Versuchsdauer ein Minimum von 10 % erreichten. Während der letzten zwei Stunden tritt auch hier wieder ein Nachlassen der Hemmwirkung mit dem Anstieg der Einbauraten auf schließlich 33 % des Kontrollwertes in Erscheinung.

Die RNS-Einbauraten fallen dagegen sofort steil ab und erreichen nach vier Stunden ihren Minimalwert von 10 %. Bei der insgesamt aufgenommenen Aktivität läßt sich ebenfalls ein sofort einsetzender, zunächst steiler und dann abflachender Rückgang der Einbauraten erkennen. Das Minimum ist auch hier nach vier Stunden mit 11 % erreicht. In den letzten zwei Versuchsstunden wird wieder eine ansteigende Tendenz sichtbar.

Die spezifische Aktivität für den hochmolekularen Bereich fällt sehr stark ab, was alleine auf die rückläufige Aktivitätsaufnahme zurückzuführen ist. Doch schon nach zwei Stunden ist das Minimum überwunden, da die hier einsetzende starke RNS-Synthesehemmung trotz zunächst noch anhaltender Einbauhemmung für den Anstieg der Werte verantwortlich ist.

(Vgl. Tab. 7a - d; Abb. 7).

Tab. 7a: (6-³H)-Uracil-Einbauraten für den kalten HClO₄-Extrakt

t/h	Kontrolle	Probe	Probe:Kontrolle
	10.800	9.450	
0	= 1,00	= 1,00	100 %
0,5	1,22	1,65	135 %
1	1,51	0,99	66 %
1,5	1,11	0,64	58 %
2	1,27	0,43	34 %
2,5	1,78	0,38	21 %
3	1,21	0,17	16 %
4	3,06	0,32	10 %
5	1,93	0,61	32 %
6	3,15	1,04	33 %

Tab. 7b: (6-³H)-Uracil-Einbauraten für die RNS

t/h	Kontrolle	Probe	Probe:Kontrolle
	7.200	6.900	
0	= 1,00	= 1,00	100 %
0,5	2,04	1,07	52 %
1	1,61	0,42	26 %
1,5	2,42	0,32	13 %
2	2,03	0,29	14 %
2,5	2,12	0,28	13 %
3	3,31	0,76	11 %
4	2,78	0,29	10 %
5	4,05	0,49	12 %
6	4,23	0,54	13 %

Tab. 7c: (6-³H)-Uracil-Gesamteinbauraten

t/h	Kontrolle	Probe	Probe:Kontrolle
	18.000	16.350	
0	= 1,00	= 1,00	100 %
0,5	1,55	1,40	90 %
1	1,55	0,75	48 %
1,5	1,63	0,51	31 %
2	1,57	0,37	24 %
2,5	1,92	0,34	18 %
3	2,05	0,51	25 %
4	2,95	0,31	11 %
5	2,78	0,56	20 %
6	3,58	0,83	23 %

Tab. 7d: Spezifische Aktivität für die RNS

t/h	Kontrolle	Probe	Probe:Kontrolle
	74	62	
0	= 1,00	= 1,00	100 %
0,5	1,57	0,89	57 %
1	1,15	0,34	30 %
1,5	1,01	0,23	23 %
2	0,80	0,19	24 %
2,5	0,57	0,16	28 %
3	0,69	0,35	51 %
4	0,43	0,15	35 %
5	0,49	0,21	43 %
6	0,41	0,21	51 %

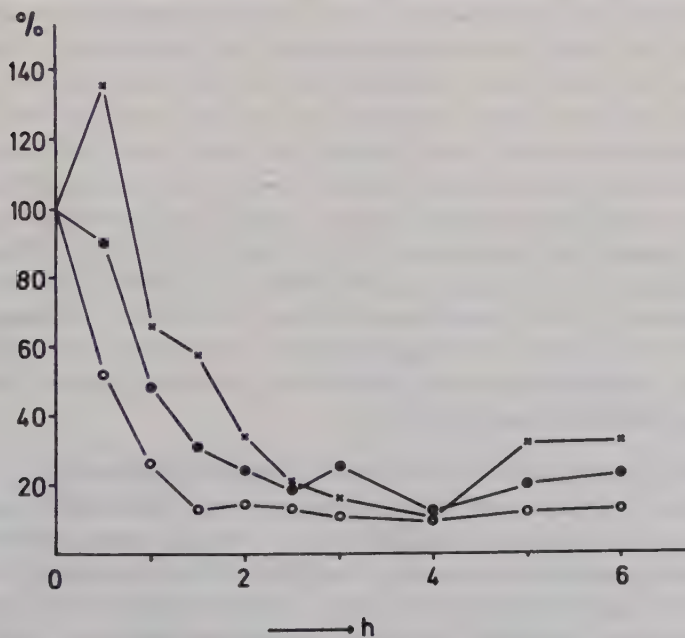


Abb. 7: Einbau von (6-³H)-Uracil in asynchron wachsender Hefe unter Vermehrungsbedingungen unter dem Einfluß von 10⁻³ Mol/Ltr. "Hydrazon" (x — x : HClO₄-Extrakt; o — o : RNS; • — • : Gesamtaufnahme).

4. Vergleichende Zusammenfassung über die hemmenden Einflüsse auf den (6-³H)-Uracil-Einbau in Hefe unter verschiedenen Wachstumsbedingungen durch "Hydrazin" und "Hydrazon"

Die unterschiedlichen Wachstumsbedingungen machen sich auch in verschiedenen Einbauraten bemerkbar. Hier soll zunächst der Syntheseverlauf in den ersten 3 Stunden verglichen werden.

Die geringste Hemmung übt das "Hydrazin" prozentual unter Vitaminmangelbedingungen bei synchronem Hefematerial aus. Sie erreicht nach 90 Minuten 20 % und nach 3 Stunden 33 %. Unter Zusatz der Vitamine B₁, B₆ und Biotin ist nach 90 Minuten bereits eine Hemmung von 57 % und nach 3 Stunden von 72 % erreicht. Dieser Unterschied zwischen den Hemmwirkungen unter den verschiedenen Wachstumsbedingungen wird verursacht durch die wesentlich stärkere Synthese der Kontrolle unter dem Einfluß der Vitamine. Die Probe wächst zwar bei Vorhandensein der Vermehrungsstoffe auch stärker als ohne diese Faktoren, jedoch ist der Unterschied hier geringer. Bei unsynchronisiertem Hefematerial tritt bereits nach 30 Minuten eine deutliche Hemmung der Syntheseaktivität auf, die nach 2,5 Stunden 70 % der Kontrolle erreicht. Auf Grund des schnelleren Wirkungseintritts muß geschlossen werden, daß große, teilungsbereite oder sich in Teilung befindliche Hefezellen stärker in ihrer Entwicklung durch "Hydrazin" getroffen werden als kleine, heranwachsende Zellen.

Auch beim "Hydrazon" tritt unter Vitaminbedingungen eine wesentlich raschere und auch stärkere Synthesehemmung auf. Dies gilt absolut und auch prozentual. Nach 3 Stunden haben sich die Hemmraten aneinander angeglichen und betragen ca. 80 %. Bei unsynchronisierter Hefe unter Vitamineinfluß tritt die "Hydrazon"-Wirkung gegenüber synchronem Material unter gleichen Bedingungen verzögert auf. Erst nach 90 Minuten werden vergleichbare Werte erreicht. Dies läßt vermuten, daß

das "Hydrazon" stärker in die Wachstums- als in die Vermehrungsphase hemmend eingreift.

Vergleichend kann gesagt werden, daß "Hydrazon" unter allen Wachstumsbedingungen eine stärkere Hemmung der Einbauraten hervorruft als das "Hydrazin". Sehr auffällig ist dabei der große Unterschied bei der Aufnahme rate in den säurelöslichen Zellpool. Während beim "Hydrazin" hier eine Hemmung erst spät eintritt oder gar der Aktivitätsgehalt über dem der Kontrolle liegt, wird er unter "Hydrazon" von Versuchsbeginn an rasch vermindert. Gibt man erst nach 3-stündigem Wachstum die Vermehrungsfaktoren hinzu, so findet unter "Hydrazon" absolut gesehen eine stärkere Stimulierung der RNS-Synthese statt als unter "Hydrazin". Dies läßt ebenfalls auf eine stärkere Beeinflussung von Zellteilungsvorgängen durch "Hydrazon" schließen.

C. II. Leucin-Einbaustudium an wachsenden Hefezellen unter verschiedenen Wachstumsbedingungen

1. Leucin-Einbau in synchronisierte Hefezellen unter Vermehrungsbedingungen

a) Leucin-Einbau unter dem Einfluß von "Hydrazin":

Es sei kurz vorausgeschickt, daß die Proteinsynthese erst nach 2,5 Stunden eine deutliche Hemmung erfährt. Die Leucin-Aufnahme in den HClO_4 -Extrakt wird in den ersten 30 Minuten nur zögernd, danach aber sehr stark gehemmt; nach zwei Stunden ist bereits der maximale Effekt mit einer Aufnahmerate von 33 % gegenüber der Kontrolle erreicht.

Der Leucin-Einbau in die Proteine ist in kürzester Zeit zu rund 90 % gehemmt. Nach zweieinhalb Stunden kann nur noch eine Einbaurrate von 5 % gegenüber der Kontrolle festgestellt werden.

Die insgesamt aufgenommene Aktivität ist im Vergleich zur Kontrolle ebenfalls um 90 % vermindert. Die spezifische Aktivität für den hochmolekularen Bereich fällt allein auf Grund des geringen Leucin-Einbaus steil bis auf 6 % nach zweieinhalb Stunden ab. (Vgl. Tab. 8a - d; Abb. 8).

Tab. 8a: L-(U- ^{14}C)Leucin-Einbauraten in den kalten HClO_4 -Extrakt.

t/h	Kontrolle	Probe	Probe:Kontrolle
0	10.350	11.220	
	= 1,00	= 1,00	100 %
0,5	1,46	1,37	94 %
1	1,32	0,88	67 %
1,5	1,16	0,83	72 %
2	1,06	0,35	33 %
2,5	0,86	0,34	40 %
3	0,64	0,27	42 %

Tab. 8b: L-(U-¹⁴C)-Leucin-Einbauraten für die Proteine

t/h	Kontrolle	Probe	Probe : Kontrolle
	5.870	6.160	
0	= 1,00	= 1,00	100 %
0,5	3,01	1,74	59 %
1	4,92	1,22	30 %
1,5	7,02	1,21	17 %
2	6,42	0,79	12 %
2,5	7,66	0,40	5 %
3	7,33	0,63	9 %

Tab. 8c: L-(U-¹⁴C)-Leucin-Gesamteinbauraten

t/h	Kontrolle	Probe	Probe:Kontrolle
	16.220	17.380	
0	= 1,00	= 1,00	100 %
0,5	2,02	1,50	74 %
1	2,62	0,99	38 %
1,5	3,28	0,96	29 %
2	3,00	0,50	27 %
2,5	3,32	0,36	11 %
3	3,06	0,40	13 %

Tab. 8d: Spezifische Aktivität für die Proteine

t/h	Kontrolle	Probe	Probe:Kontrolle
	183	193	
0	= 1,00	= 1,00	100 %
0,5	2,76	1,64	59 %
1	3,76	1,44	38 %
1,5	4,69	0,96	20 %
2	4,48	0,48	11 %
2,5	3,23	0,19	6 %
3	1,88	0,26	14 %

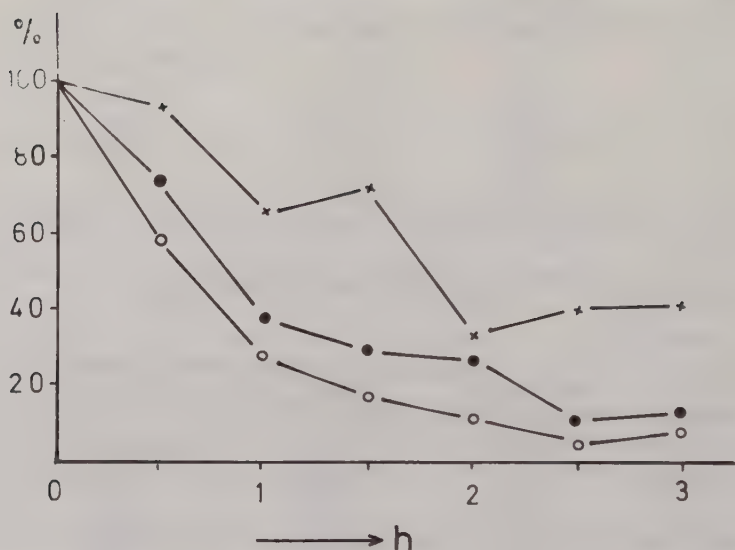


Abb. 8: Einbau von L-(U-¹⁴C)-Leucin in synchron wachsender Hefe unter Vermehrungsbedingungen unter dem Einfluß von 10⁻³ Mol/Ltr. "Hydrazin". (x — x: HClO₄-Extrakt; o — o: Protein; • — •: Gesamtaufnahme)

b) Leucin-Einbau unter dem Einfluß von "Hydrazon":

Unter dem Einfluß dieser Substanz kommt es nach 2 Stunden zu einer Proteinsynthesehemmung. Der Einfluß auf die Leucinaufnahme in die niedermolekularen Zellanteile ist so stark ausgeprägt, daß nach 1,5 und 2 Stunden nur noch Aktivitätsmengen von 24 % des Kontrollwertes gefunden werden können.

Die Einbauraten im Protein werden in den ersten zwei Stunden drastisch auf 12 % gesenkt.

Auch die Gesamtaufnahme wird gleich zu Beginn stark gedrosselt, nach 3 Stunden beträgt sie nur noch 13 %.

Die stark gesenkte spezifische Aktivität für den hochmolekularen Bereich wird durch den steilen Abfall der Protein-Einbauraten bedingt. (Vgl. Tab. 9a - d; Abb. 9).

Tab. 9a: L-(U-¹⁴C)-Leucin-Einbauraten in den kalten HClO₄-Extrakt.

t/h	Kontrolle	Probe	Probe:Kontrolle
	10.350	10.680	
0	= 1,00	= 1,00	100 %
0,5	1,46	0,81	55 %
1	1,32	0,46	35 %
1,5	1,16	0,28	24 %
2	1,06	0,25	24 %
2,5	0,86	0,24	28 %
3	0,64	0,21	33 %

Tab. 9b: L-(U-¹⁴C)-Leucin-Einbauraten für die Proteine

t/h	Kontrolle	Probe	Probe:Kontrolle
	5.870	5.930	
0	= 1,00	= 1,00	100 %
0,5	3,01	1,37	46 %
1	4,92	1,59	40 %
1,5	7,02	1,19	17 %
2	6,42	0,79	12 %
2,5	7,66	1,01	13 %
3	7,33	0,71	10 %

Tab. 9c: L-(U-¹⁴C)-Leucin-Gesamteinbauraten

t/h	Kontrolle	Probe	Probe:Kontrolle
	16.220	16.610	
0	= 1,00	= 1,00	100 %
0,5	2,02	1,01	50 %
1	2,62	0,86	33 %
1,5	3,28	0,60	18 %
2	3,00	0,44	15 %
2,5	3,32	0,51	15 %
3	3,06	0,39	13 %

Tab. 9d: Spezifische Aktivität für die Proteine

t/h	Kontrolle	Probe	Probe:Kontrolle
	183	185	
0	= 1,00	= 1,00	100 %
0,5	2,76	1,14	41 %
1	3,76	1,16	31 %
1,5	4,69	0,62	13 %
2	4,48	0,39	9 %
2,5	3,23	0,48	15 %
3	1,88	0,27	14 %

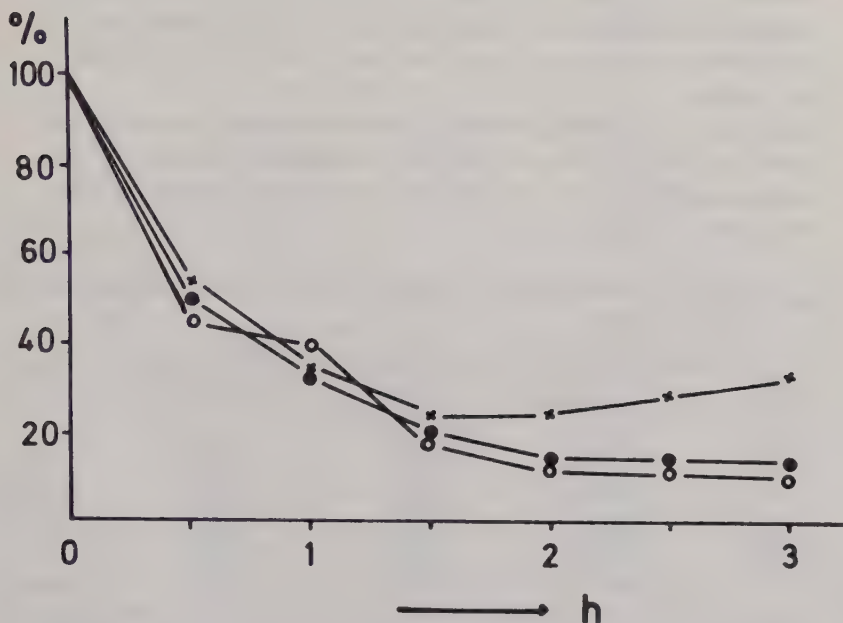


Abb. 9: Einbau von L-(U-¹⁴C)-Leucin in synchron wachsender Hefe unter Vermehrungsbedingungen unter dem Einfluß von 10⁻³ Mol/Ltr. "Hydrazon". (x — x: HClO₄-Extrakt; o — o: RNS; • — • : Gesamtaufnahme).

c) Leucin-Einbau unter dem Einfluß von N,N-Dimethylhydrazin:

Auf die Proteinsynthese konnte kein hemmender Einfluß des Dimethylhydrazin festgestellt werden. Die Hemmwirkung auf die Leucin-Aufnahme in den niedermolekularen Zellanteil ist nur unwesentlich. Hier zeigt sich nur in der ersten halben Stunde ein leichter Abfall auf 78 %, in der folgenden Versuchszeit pendeln die Werte dann ständig um 100 %.

Bei den Einbauraten in den Proteinen kann ebenfalls nur ein unwesentlicher Abfall festgestellt werden. Bei der Gesamt-

aktivitätsaufnahme kann man nicht von einer eigentlichen Hemmung sprechen. Die teilweise um $\pm 10\%$ schwankenden Werte könnte eher als Folge methodischer Fehler angesehen werden.

Da auch keine ausgesprochene Synthesehemmung ersichtlich wird, weichen die Werte für die spezifische Aktivität im hochmolekularen Bereich kaum von der Kontrolle ab. (Vgl. Tab. 10a - d; Abb. 10).

Tab. 10a: L-(U- 14 C)-Leucin-Einbauraten für den kalten HClO_4 -Extrakt

t/h	Kontrolle	Probe	Probe:Kontrolle
	24.470	28.010	
0	= 1,00	= 1,00	100 %
0,5	0,78	0,61	78 %
1	0,64	0,60	94 %
1,5	0,48	0,47	98 %
2	0,41	0,37	90 %
2,5	0,28	0,24	86 %
3	0,17	0,17	100 %

Tab. 10b: L-(U- 14 C)-Leucin-Einbauraten für die Proteine

t/h	Kontrolle	Probe	Probe:Kontrolle
	66.567	66.353	
0	= 1,00	= 1,00	100 %
0,5	1,59	1,43	90 %
1	1,64	1,50	91 %
1,5	1,88	1,66	88 %
2	1,99	1,73	87 %
2,5	1,69	1,72	102 %
3	2,30	2,24	97 %

Tab. 10c: L-(U- 14 C)-Leucin-Gesamteinbauraten

t/h	Kontrolle	Probe	Probe : Kontrolle
	94.037	94.363	
0	= 1,00	= 1,00	100 %
0,5	1,35	1,19	88 %
1	1,35	1,24	92 %
1,5	1,47	1,31	89 %
2	1,52	1,33	88 %
2,5	1,28	1,26	98 %
3	1,68	1,63	97 %

Tab. 10d: Spezifische Aktivität für die Proteine

t/h	Kontrolle	Probe	Probe:Kontrolle
	4.438	3.492	
0	= 1,00	= 1,00	100 %
0,5	1,32	1,18	89 %
1	1,12	1,36	121 %
1,5	0,94	1,09	116 %
2	0,85	1,03	121 %
2,5	0,72	0,88	122 %
3	0,57	0,64	112 %

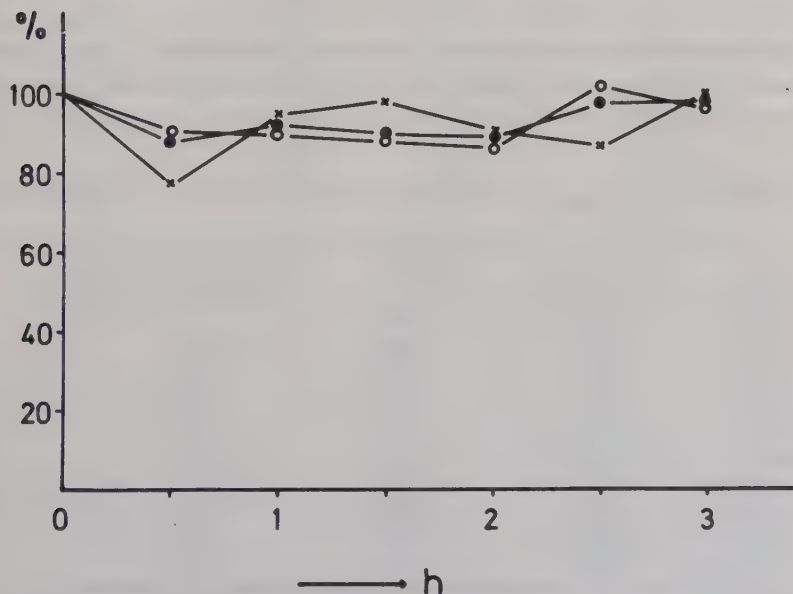


Abb. 10: Einbau von L-(U- 14 C)-Leucin in synchron wachsender Hefe unter Vermehrungsbedingungen unter dem Einfluß von 10^{-3} Mol/Ltr. N,N-Dimethylhydrazin (x — x: HClO₄-Extrakt; o — o : RNS; • — • : Gesamtaufnahme)

C.II. 2. Leucin-Einbau in synchronisierte Hefezellen unter
Zusatz der Vitamine nach 3 Stunden

a) Leucin-Einbau unter dem Einfluß von "Hydrazin":

Unter dem Einfluß des "Hydrazin" entwickelt sich im niedermolekularen Bereich eine deutliche Hemmung nach ca. 60 min, die nach 3 Stunden 57 % erreicht hat. Nach Zugabe der Vermehrungsstoffe tritt noch eine leichte Steigerung der Aufnahmehemmung ein, die durch eine Aufnahmesteigerung bei der Kontrolle bedingt ist.

Bei der Proteinsynthese tritt in der Wachstumsphase nur eine vorübergehende geringfügige Verlangsamung der Synthesegeschwindigkeit bei der Probe auf. Erst 2 Stunden nach Vitaminzugabe kommt es zu einer stärkeren Synthesehemmung gegenüber der Kontrolle, da hier zu diesem Zeitpunkt die F_1 -Generation voll ausgebildet wird, während die Probe keine Sprossung durchmacht.

Eine Gesamtaufnahmehemmung macht sich erst nach 90 Minuten mit einem Wert von 74 % der Kontrolle bemerkbar. Eine Stunde nach Vitaminzugabe fallen dann die Gesamteinbauten auf 32 % gegenüber der Kontrolle ab. (Vgl. Tab. 11a - c; Abb. 11).

Tab. 11a: L-(U- 14 C)-Leucin-Einbausraten für den kalten $HClO_4$ -Extrakt

t/h	Kontrolle	Probe	Probe:Kontrolle
	7.770	7.680	
0	= 1,00	= 1,00	100 %
0,5	2,83	3,16	112 %
1,5	1,63	1,19	73 %
2	0,66	0,38	57 %
Biotin 2,5	0,46	0,22	48 %
Vit.B ₁ 3	0,42	0,18	43 %
B ₆ 3,5	0,55	0,23	42 %
4	0,61	0,21	34 %
4,5	0,69	0,22	32 %
5	0,58	0,26	45 %
6	0,51	0,31	61 %

Tab. 11b: L-(U-¹⁴C)-Leucin-Einbauraten für die Proteine

t/h		Kontrolle	Probe	Probe:Kontrolle
		4.120	3.870	
	0	= 1,00	= 1,00	100 %
	0,5	1,43	1,64	115 %
	1,5	0,92	0,67	73 %
	2	0,96	0,83	86 %
	2,5	0,78	0,82	105 %
Biotin	3	0,67	0,68	101 %
Vit.B ₁ →	3,5	0,60	0,70	117 %
B ₆	4	0,81	0,93	115 %
	4,5	1,22	1,19	98 %
	5	3,20	1,00	31 %
	6	3,87	1,00	26 %

Tab. 11c: L-(U-¹⁴C)-Leucin-Gesamteinbauraten

t/h		Kontrolle	Probe	Probe:Kontrolle
		11.890	11.550	
	0	= 1,00	= 1,00	100 %
	0,5	2,34	2,65	113 %
	1,5	1,38	1,02	74 %
	2	0,63	0,45	71 %
	2,5	0,57	0,42	74 %
Biotin	3	0,51	0,35	69 %
Vit.B ₁ →	3,5	0,44	0,38	86 %
B ₆	4	0,68	0,45	66 %
	4,5	0,88	0,54	61 %
	5	1,48	0,51	34 %
	6	1,68	0,54	32 %

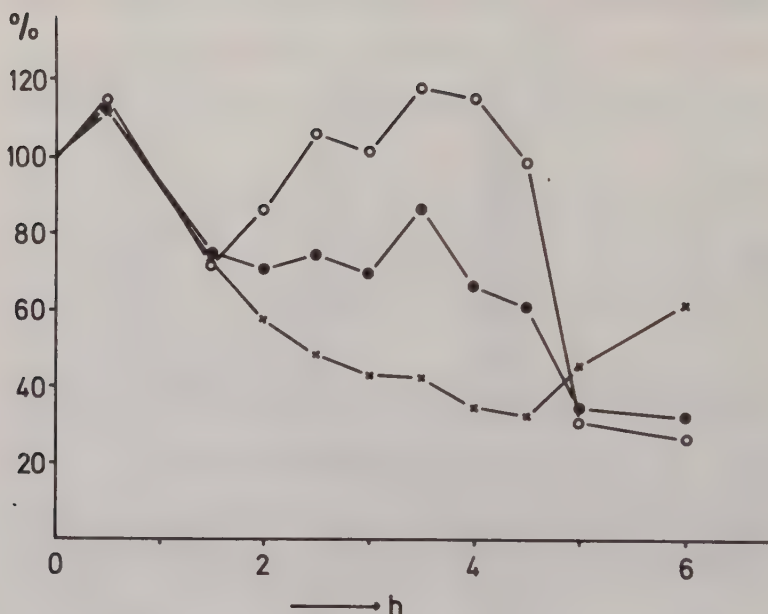


Abb. 11: Einbau von L-(U-¹⁴C)-Leucin in synchron wachsender Hefe bei Zugabe der Vermehrungsfaktoren nach 3 Stunden (↑) unter dem Einfluß von 10⁻³ Mol/Ltr. "Hydrazin". (x — x : HClO₄-Extrakt; o — o : RNS; • — • : Gesamtaufnahme).

b) Leucin-Einbau unter dem Einfluß von "Hydrazon"

Das "Hydrazon" führt sofort zu einer starken Absenkung der Aktivität im säurelöslichen Zellpool. Die gefundenen Werte erreichen nach 3 Stunden reiner Wachstumszeit absolut gesehen ihren tiefsten Punkt. Prozentual steigen sie jedoch wieder an, da die Aufnahme der Kontrolle nach hohen Anfangswerten langsam abflacht. Nach Vitaminzugabe kommt es auf Grund eines Abfalls bei der Kontrolle zu einem kurzfristigen Anstieg der

Aktivitätsaufnahme, um anschließend relativ gegenüber der Kontrolle stark abzufallen, da diese auf Grund der Ausbildung der F_1 -Generation eine stärkere Syntheseleistung aufweist.

Auch im hochmolekularen Bereich tritt bei der Probe eine rasche, starke Synthesehemmung ein. Interessant ist die Tatsache, daß nach Zugabe der Vitamine die Syntheseleistung stark ansteigt und die der Kontrolle sowohl absolut als auch prozentual erheblich übertrifft. Dieser Anstieg bei der Probe erstreckt sich nur über einen Zeitraum von 90 Minuten, währenddessen bei der Kontrolle das genetische Material für die F_1 -Generation gebildet wird. Das rasche Anwachsen der Tochterzellen macht sich durch eine vermehrte Proteinsynthese bemerkbar, die die Syntheseleistung der Probe deutlich übertrifft.

Auf Grund dieser Tatsache ist auch die Entwicklung der Gesamteinbauraten zu erklären. (Vgl. Tab. 12a - c; Abb. 12).

Tab. 12a: L-(U-¹⁴C)-Leucin-Einbauraten für den kalten HClO₄-Extrakt

	t/h	Kontrolle	Probe	Probe:Kontrolle
	0	7.700	6.720	
	0,5	= 1,00	= 1,00	100 %
	1,5	2,83	0,54	19 %
	2	1,63	0,44	27 %
	2,5	0,66	0,44	67 %
Biotin	3	0,46	0,33	72 %
Vit.B ₁	3,5	0,42	0,32	76 %
B ₆	4	0,35	0,33	94 %
	4,5	0,61	0,29	48 %
	5	0,69	0,32	46 %
	6	0,58	0,29	50 %
		0,51	0,26	51 %

Tab. 12b: L-(U-¹⁴C)-Leucin-Einbauraten für die Proteine

	t/h	Kontrolle	Probe	Probe:Kontrolle
	0	4.120	3.930	
	0,5	= 1,00	= 1,00	100 %
	1,5	1,43	0,88	62 %
	2	1,31	0,76	58 %
	2,5	0,96	0,61	64 %
Biotin	3	0,78	0,58	74 %
Vit.B ₁	3,5	0,67	0,69	103 %
B ₆	4	0,60	1,20	200 %
	4,5	0,81	1,41	174 %
	5	1,22	1,21	99 %
	6	3,20	1,21	38 %
		3,87	1,51	39 %

Tab. 12c: L-(U-¹⁴C)-Leucin-Gesamteinbauraten

	t/h	Kontrolle	Probe	Probe:Kontrolle
	0	11.890	10.650	
	0,5	= 1,00	= 1,00	100 %
	1,5	2,34	0,66	28 %
	2	1,38	0,65	47 %
	2,5	1,32	0,50	66 %
Biotin	3	0,57	0,42	74 %
Vit.B ₁	3,5	0,51	0,53	104 %
B ₆	4	0,98	0,65	148 %
	4,5	0,68	0,71	104 %
	5	0,88	0,65	74 %
	6	1,48	0,63	43 %
		1,68	0,72	43 %

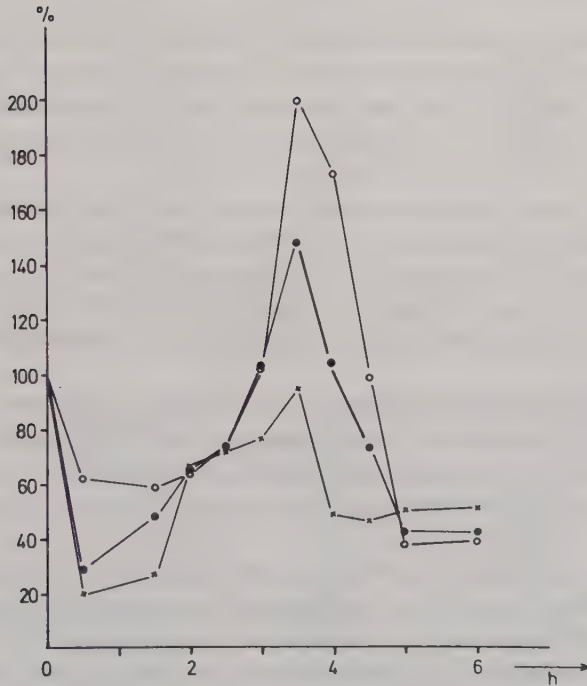


Abb. 12: Einbau von L-(U-¹⁴C)-Leucin in synchron wachsender Hefe bei Zugabe der Vermehrungsfaktoren nach 3 Std. (↑) unter dem Einfluß von 10⁻³ Mol/Ltr. "Hydrazon". (x — x: HClO₄-Extrakt; o — o: Protein; • — •: Gesamtaufnahme).

C.II. 3. Leucin-Einbau in unsynchronisierte Hefezellen

a) Leucin-Einbau unter dem Einfluß von "Hydrazin":

Die Aktivitätsraten im niedermolekularen Bereich sind während der ersten 90 Versuchsminuten leicht gegenüber der Kontrolle erhöht. Dann erfolgt der Rückgang auf 54 % zum Zeitpunkt 4 h, ein Wert, der sich während der letzten zwei Stunden kaum ändert.

In der ersten Versuchsstunde werden auch die Einbauraten im hochmolekularen Bereich kaum beeinflusst. Dann allerdings wird die Aktivitätsaufnahme rapide gesenkt, so daß schon nach einer weiteren Stunde nur noch 12 % der Kontrolle erreicht werden, um zu Versuchsende sogar auf 7 % abzufallen.

Die Gesamt-Leucin-Aufnahme wird ebenfalls erst nach einer Stunde eingeschränkt. Abgesehen von leichten Schwankungen, gehen hier die Einbauraten kontinuierlich bis auf schließlich 14 % des Kontrollwertes zum Zeitpunkt 6 h zurück.

Bei der spezifischen Aktivität für das Protein kann während der ersten Stunde kein deutlicher Unterschied zur Kontrolle festgestellt werden. Dann aber erfolgt bereits in den nächsten 30 Minuten ein steiler Abfall der Werte auf 52 %, der sich bis zum Zeitpunkt 2,5 h noch bis zu 14 % fortsetzt. Bis zu Versuchsende tritt dann keine wesentliche Veränderung mehr auf. Diese Entwicklung der spezifischen Aktivität beruht weitgehend auf den stark gesenkten Einbauraten. Die der Kontrolle gegenüber stark eingeschränkte Proteinsyntheseleistung macht sich kaum bemerkbar, da die Vergleichswerte, besonders zu den beiden letzten Meßzeitpunkten, durch die sehr hohen Kontroll-Einbauraten stark ansteigen.
(Vgl. Tab. 13a - d; Abb. 13).

Tab. 13a: L-(U- 14 C)-Leucin-Einbauraten für den kalten HClO_4 -Extrakt

t/h	Kontrolle	Probe	Probe:Kontrolle
	10.380	9.780	
0	= 1,00	= 1,00	100 %
0,5	1,19	1,11	93 %
1	0,95	1,23	129 %
1,5	0,88	0,99	113 %
2	0,91	0,76	84 %
2,5	0,58	0,42	72 %
3	0,54	0,42	78 %
4	0,39	0,21	54 %
5	0,46	0,26	57 %
6	0,36	0,20	56 %

Tab. 13b: L-(U- 14 C)-Leucin-Einbauraten für die Proteine

t/h	Kontrolle	Probe	Probe:Kontrolle
	3.610	3.720	
0	= 1,00	= 1,00	100 %
0,5	2,99	2,75	92 %
1	3,40	3,29	97 %
1,5	2,32	1,07	46 %
2	6,93	0,81	12 %
2,5	5,49	0,65	12 %
3	3,82	0,62	16 %
4	3,78	0,57	15 %
5	5,45	0,72	13 %
6	7,55	0,55	7 %

Tab. 13c: L-(U- 14 C)-Leucin-Gesamteinbauraten

t/h	Kontrolle	Probe	Probe : Kontrolle
	13.990	13.500	
0	= 1,00	= 1,00	100 %
0,5	1,66	1,56	94 %
1	1,58	1,80	114 %
1,5	1,25	1,01	81 %
2	2,46	0,76	31 %
2,5	1,85	0,48	26 %
3	1,39	0,48	35 %
4	1,27	0,31	24 %
5	1,74	0,38	22 %
6	2,21	0,30	14 %

Tab. 13d: Spezifische Aktivität für die Proteine

t/h	Kontrolle	Probe	Probe:Kontrolle
0	72 = 1,00	74 = 1,00	100 %
0,5	2,58	2,55	99 %
1	2,43	2,76	114 %
1,5	1,33	0,69	52 %
2	3,22	0,42	13 %
2,5	1,99	0,28	14 %
3	1,07	0,24	22 %
4	0,74	0,19	26 %
5	0,81	0,16	20 %
6	0,86	0,12	14 %

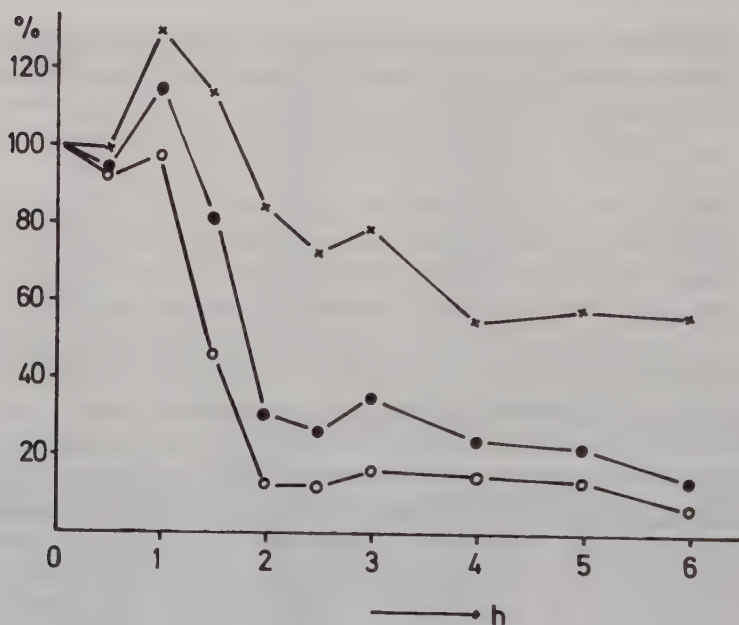


Abb. 13: Einbau von L-(U-¹⁴C)-Leucin in asynchron wachsender Hefe unter Vermehrungsbedingungen unter dem Einfluß von 10⁻³ Mol/Ltr. "Hydrazin". (x — x: HClO₄-Extrakt; o — o: RNS; • — • : Gesamtaufnahme).

b) Leucin-Einbau unter dem Einfluß von "Hydrazon":

Die Leucinaufnahme in den Zellpool ist bereits nach 30 Minuten auf 60 % gesenkt und erfährt im weiteren Versuchsablauf keine größeren Veränderungen mehr.

Im hochmolekularen Bereich tritt eine deutlichere Hemmung erst nach 1,5 Stunden ein. Sie erreicht bei Versuchsende eine Rate von 80 %. Bei der Gesamtaktivitätsaufnahme zeigt sich, daß der Einbau innerhalb der ersten 60 Minuten nur wenig verändert ist. Erst dann macht sich eine relativ starke Einbauhemmung bemerkbar, indem die Raten mit leichten Schwankungen auf 30 % nach 5 und 6 Stunden absinken.

Bei der spezifischen Aktivität für den hochmolekularen Bereich ist in den ersten 60 Minuten kaum ein Unterschied zur Kontrolle festzustellen. Innerhalb der folgenden 60 Minuten kommt es zu einem steilen Abfall auf 57 %, der sich bis zu Versuchsende nicht mehr wesentlich ändert. Die während dieses Zeitraumes noch stark absinkenden Proteineinbauraten werden zum Teil durch die verstärkte Synthesehemmung kompensiert. (Vgl. Tab. 14a - d; Abb. 14).

Tab. 14a: L-(U-¹⁴C)-Leucin-Einbauraten für den kalten HClO₄-Extrakt.

t/h	Kontrolle	Probe	Probe : Kontrolle
	10.380	9.030	
0	= 1,00	= 1,00	100 %
0,5	1,19	0,71	60 %
1	0,95	0,53	56 %
1,5	0,88	0,47	53 %
2	0,91	0,41	45 %
2,5	0,58	0,38	66 %
3	0,54	0,27	50 %
4	0,39	0,23	59 %
5	0,46	0,22	48 %
6	0,36	0,24	67 %

Tab. 14b: L-(U-¹⁴C)-Leucin-Einbauraten für die Proteine

t/h	Kontrolle	Probe	Probe:Kontrolle
	3.610	2.610	
0	= 1,00	= 1,00	100 %
0,5	3,93	3,30	84 %
1	5,90	5,13	87 %
1,5	7,03	4,43	63 %
2	9,57	4,69	49 %
2,5	7,61	3,73	49 %
3	5,29	1,64	31 %
4	5,30	1,75	33 %
5	7,48	1,57	21 %
6	5,70	1,14	20 %

Tab. 14c: L-(U-¹⁴C)-Leucin-Gesamteinbauraten

t/h	Kontrolle	Probe	Probe : Kontrolle
	13.990	11.640	
0	= 1,00	= 1,00	100 %
0,5	1,91	1,49	78 %
1	2,19	1,56	71 %
1,5	2,25	1,36	60 %
2	2,46	1,37	56 %
2,5	1,85	1,13	61 %
3	1,39	0,57	41 %
4	1,27	0,57	45 %
5	1,74	0,53	30 %
6	2,21	0,67	30 %

Tab. 14d: Spezifische Aktivität für die Proteine

t/h	Kontrolle	Probe	Probe : Kontrolle
	72	65	
0	= 1,00	= 1,00	100 %
0,5	2,58	2,32	90 %
1	2,43	2,86	118 %
1,5	2,83	2,34	83 %
2	3,22	1,85	57 %
2,5	1,99	1,28	64 %
3	1,07	0,52	49 %
4	0,74	0,51	69 %
5	0,81	0,40	49 %
6	0,86	0,57	66 %

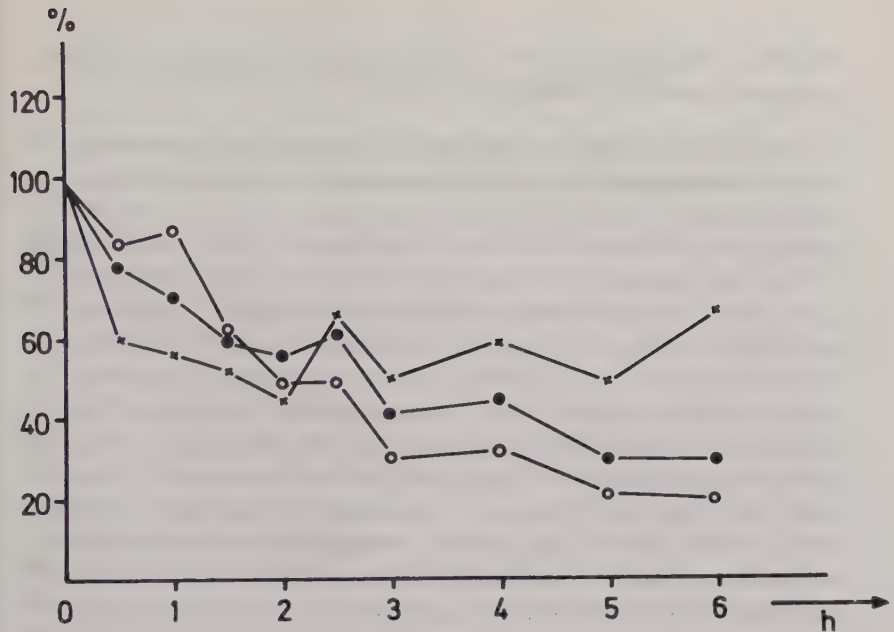


Abb. 14: Einbau von L-(U-¹⁴C)-Leucin in asynchron wachsender Hefe unter Vermehrungsbedingungen unter dem Einfluß von 10⁻³ Mol/Ltr. "Hydrazon" (x — x: HClO₄-Extrakt; o — o: RNS; • — •: Gesamtaufnahme).

C.II. 4. Vergleichende Zusammenfassung über die hemmenden Einflüsse auf den L-(U-¹⁴C)-Leucin-Einbau in Hefe unter verschiedenen Wachstumsbedingungen durch "Hydrazin" und "Hydrazon"

Hier hemmt das "Hydrazin" ähnlich dem Uracil-Einbau die Proteinsynthese der Probe unter Vitaminzufuhr prozentual erheblich stärker als im vitaminfreien Medium auf Grund der starken Wachstumsentwicklung der Kontrolle. Absolut gesehen tritt die Synthesehemmung im ersten Fall jedoch später ein. Nach 3 Stunden ist die Hemmrage etwa gleich groß. Auch bei unsynchronisierten Zellen unter Zufuhr der Vermehrungsfaktoren von Anfang an kommt es erst nach 90 Minuten zu einer deutlichen

Hemmung, die dann aber mit einer Rate von 85 % nach 3 Stunden recht deutlich ausgeprägt ist.

Das "Hydrazon" hemmt ebenfalls bei synchronen Hefezellen unter Vitaminzusatz die Proteinsynthese stärker als unter Vitaminmangel. Der Unterschied ist jedoch geringer als beim "Hydrazin". Bei unsynchronisiertem Material wird die Proteinbildung am wenigsten beeinflusst. Auffallend ist auch hier die starke und rasch eintretende Aufnahmehemmung von aktivem Leucin in den säurelöslichen Zellpool unter allen Wachstumsbedingungen, die das "Hydrazin" deutlich übertreffen. Beim Vergleich zwischen der Einwirkung auf synchrones bzw. asynchrones Hefematerial kann wie bei der RNS-Synthese auch bei der Proteinsynthese eine größere Empfindlichkeit gegenüber "Hydrazon" der kleinen, wachsenden Zellen festgestellt werden. Dies trifft auch für das "Hydrazin" im Gegensatz zur RNS-Synthese für die Proteinsynthese zu. Das Dimethylhydrazin bleibt praktisch ohne Einfluß auf die Proteinsynthese von Hefe.

C. III. Ergebnisse aus DNS-Markierungsversuchen

Da die Hefe über keine Thymidinkinase verfügt (33), ist eine DNS-Markierung mit Thymin oder Thymidin nicht möglich.

ECKSTEIN (34) gibt an, daß eine radioaktive Markierung der Hefe-DNS mit Thymidin-Monophosphat möglich sei. Eigene Versuche mit C^{14} -TMP an unsynchronisierten Hefezellen führten bei 20-minütiger Inkubation mit $0,66 \mu\text{Ci } C^{14}\text{-TMP/3 ml}$ Hefesuspension zu keinem positiven Ergebnis. Während des vierstündigen Wachstums verdoppelte die unbehandelte Hefe ihre DNS-Menge erwartungsgemäß. Die sehr niedrigen "Einbauraten" bleiben jedoch zu einem Zeitpunkt konstant, sowohl beim Kontrollansatz als auch bei den mit Hydrazinderivaten behandelten Probeansätzen. Weiterhin konnte festgestellt werden, daß die gemessenen Aktivitäten weitaus höher ausfielen, wenn man den Waschvorgang mit eiskalter 0,9 %iger Kochsalzlösung nach abgeschlossener Markierungszeit ausfallen ließ. Das deutet darauf hin, daß die niedrigen, konstanten dpm-Werte durch restliches kontaminiertes TMP zustandekommen.

BURTON (35) gibt zwei Methoden an, nach denen man die hochmolekulare DNS von der RNS trennen kann. Das würde die Möglichkeit geben, die DNS auch mit nicht DNS-spezifischen Basen bzw. Nukleosiden zu markieren.

Auch hier konnten dahingehende Versuche keine verlässlichen Ergebnisse erbringen. Nach der ersten Vorschrift sollte die RNS durch 30-minütiges Rühren mit 1 n NaOH bei 37°C eliminiert werden. (Vgl. methodischer Teil). Die photometrischen DNS- und RNS-Bestimmungen ergaben jedoch eine weitgehende Zerstörung der DNS, während noch RNS-Mengen im meßbaren Bereich nachgewiesen werden konnten, und zwar handelt es sich noch um $1/12$ der Gesamt-RNS-Menge, die nach dem normalen Zellaufschluß ermittelt wurde. Zum Vergleich der DNS-Mengen wurde ebenfalls eine Kontrollbestimmung nach üblich durchgeführtem Zellaufschluß gemacht.

Die RNS-Eliminierung durch 18-stündige Inkubation der Hefezellen mit KOH bei 37° C im Trockenschrank war erfolgreich, doch mußte festgestellt werden, daß die DNS-Menge ebenfalls durchschnittlich auf die Hälfte der ursprünglichen Menge reduziert wurde. Außerdem lag keine proportionale DNS-Steigerung gemäß der eingesetzten Hefemengen vor, die bei einer Kontrollbestimmung nach üblicher Aufarbeitungsmethode eindeutig nachgewiesen wurde. Auch eine jüngere Methode nach SLATER (36), die einer modifizierten Methode nach BURTON gleichkommt, bleibt ohne klare Aussagekraft.

C. IV. Säulenchromatographische Trennung der säurelöslichen Nukleobausteine

Eine Einbauhemmung von markiertem Uracil in die laufende RNS-Synthese kann durch verminderte Syntheseaktivität oder mangelnde Möglichkeit der Verwertung des angebotenen Uracil bedingt sein. Dies wäre in Form einer Phosphorylierungshemmung denkbar.

Die Aktivitätsverteilung im säurelöslichen Zellpool auf Uracil/Urudin einerseits und Urudin-mono-, -di- und -triphosphat andererseits zeigt Tab. 15. Als Beispiel der säulenchromatographischen Trennung mit der Aktivitätsverteilung auf Basen- und Phosphatpeaks soll die Abb. 15 dienen (S. 59). Die Auftrennung des säurelöslichen Zellpools wurde nach einem von PFLÜGER (37) entwickelten Verfahren mit Hilfe einer PEI-Cellulose-Säule durchgeführt.

C. IV. 1. Verteilung des Uracil unter dem Einfluß von "Hydrazin"

Wie schon die Wachstumsversuche zeigten, hemmt das "Hydrazin" in hohem Maße die Aufnahme von (6-³H)-Uracil in den Nukleotid-Pool. Der Hauptanteil der Aktivität wird mit 39 % im Basenpeak gefunden. Dies weist auf eine Beeinträchtigung der Phosphorylierung hin. Entsprechend ist die Aktivität im Triphosphatanteil vermindert. Der Aktivitätsgehalt im UDP unterscheidet sich nur geringfügig von dem entsprechenden Kontrollwert.

C. IV. 2. Verteilung des Uracil unter dem Einfluß von "Hydrazon"

Diese Substanz hemmt die Uracil-Aufnahme in den Nukleotid-Pool etwa im gleichen Ausmaß wie das "Hydrazin". Bei der Betrachtung der prozentualen Aktivitätsverteilung auf die entsprechenden vier Peaks wird kein so starker Eingriff in die

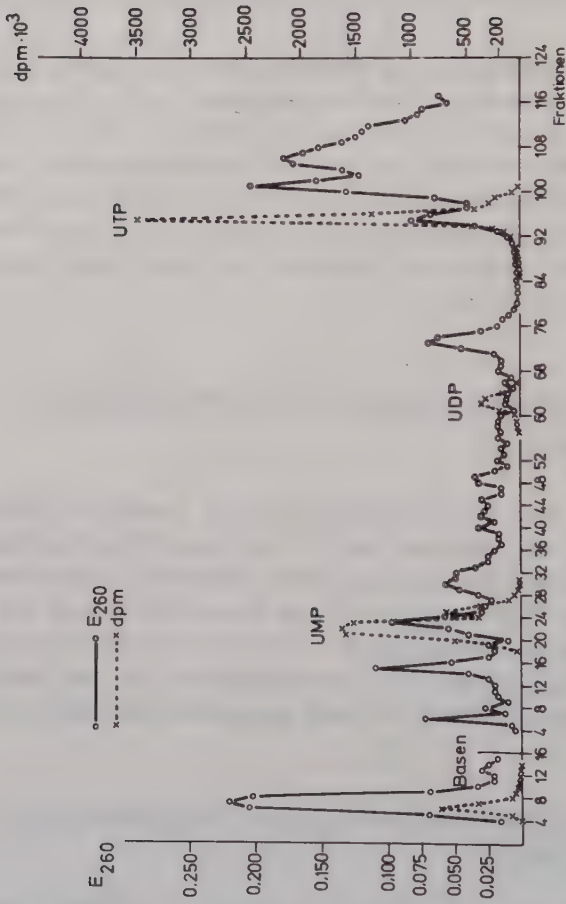


Abb. 15: Auftrennung des säurelöslichen $HClO_4$ -Extrakts von unbehandelten Hefezellen an einer PEI-Cellulose-Säule nach Markierung mit $(6-^3H)$ -Uracil (OD: $\circ$ — $\circ$); dpm: x — x)

Phosphorylierung erkennbar wie beim "Hydrazin". Der Basenanteil ist mit 12 % nur leicht gegenüber der Kontrolle erhöht. Der Tri-phosphatanteil ist zwar niedriger als bei der Kontrolle, dagegen sind aber Di- und Monophosphatanteile erhöht.

C.IV. 3. Verteilung des H^3 -Uracil unter dem Einfluß von
N,N-Dimethylhydrazin

Zu diesem Zeitpunkt (2 Stunden) ist die H^3 -Uracilaufnahme in den Nukleotid-Pool unter dem Einfluß des Dimethylhydrazin noch nicht gehemmt. Bei der Verteilung der Aktivität ergibt sich nahezu das gleiche Bild wie beim "Hydrazon". Nur ist hier keine Veränderung gegenüber der Kontrolle im Diphosphatanteil zu erkennen. Dafür wird etwas mehr Uracil zum UMP phosphoryliert als unter der Wirkung des "Hydrazon".

Tab. 15: Prozentuale Verteilung des ($6-^3H$)-Uracil auf Uracil/Uridin, UMP, UDP und UTP nach zweistündigem Wachstum unter dem Einfluß der Testsubstanzen

	Uracil/ Uridin	UMP	UDP	UTP
Kontrolle	9 %	31 %	8 %	52 %
"Hydrazin"	39 %	30 %	9 %	22 %
"Hydrazon"	12 %	40 %	10 %	38 %
N,N-Dimethyl- hydrazin	11 %	42 %	8 %	39 %

Tab. 16: Verteilung des (6-³H)-Uracil unter Einfluß der Substanzen, prozentual mit der Kontrolle verglichen

	Uracil/ Uridin	UMP	UDP	UTP
Kontrolle $\hat{=}$ K	100 %	100 %	100 %	100 %
"Hydrazin" $\hat{=}$ P ₁	456 %	97 %	112,5 %	40 %
"Hydrazon" $\hat{=}$ P ₂	134 %	132 %	125 %	72 %
N,N-Dimethyl- hydrazin $\hat{=}$ P ₃	133 %	137 %	100 %	73 %

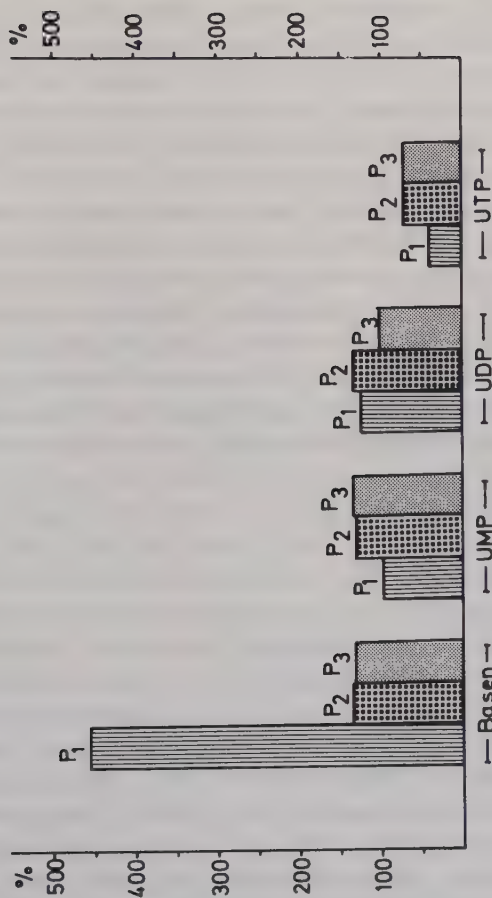


Abb. 16: Der Gehalt an (6-³H)-Uracil im Basen/Nukleosid, Mono-, Di- und Triphosphat-
anteil des löslichen HClO₄-Extraktes von synchron wachsender Hefe unter dem
Einfluß von 10-3 Mol/Ltr. "Hydrazin" (P₁), "Hydrazon" (P₂) und N,N-Dimethyl-
hydrazin (P₃)

D. Diskussion

Der von LANGE (30) gefundene negative Einfluß von N-Methyl-N- β -chloräthylhydrazin ("Hydrazin"), N'-Methyl-N- β -chloräthylbenzaldehydhydrazon ("Hydrazon") und z. T. auch N,N-Dimethylhydrazin auf das Wachstum und die Vermehrung von Hefezellen konnte durch Messung der Aufnahme- und Einbauraten von (6- ^3H)-Uracil und L-(U- ^{14}C)-Leucin bei der RNS- und Proteinsynthese näher analysiert werden. Dabei wurde festgestellt, daß die beiden Substanzen teilweise unterschiedliche Wirkungsspektren besitzen.

So hemmt das "Hydrazin" die RNS-Synthese bei unsynchronisierten Hefezellen rascher als bei synchronisiertem Material, woraus geschlossen werden muß, daß große, sich in Teilung befindliche Zellen stärker betroffen werden als kleine, heranwachsende. Die Wirkung des "Hydrazon" ist genau umgekehrt, so daß hier ein spezifischer Einfluß auf das eigentliche Wachstum angenommen werden muß. Interessant ist in diesem Zusammenhang die Aufnahme von (6- ^3H)-Uracil und L-(U- ^{14}C)-Leucin in den säurelöslichen Zellpool.

Während beim "Hydrazin" in der ersten Versuchsphase kaum eine Aufnahmehemmung, ja sogar Werte oberhalb der Kontrolle festzustellen sind, tritt unter dem Einfluß von "Hydrazon" sofort eine starke und nachhaltige Aktivitätsverminderung auf. Dies führt zu der Vermutung, daß unter "Hydrazin" die Aktivität zunächst ungehindert in die Zelle aufgenommen wird, aber nicht in vollem Maße wie bei der Kontrolle zur RNS- bzw. Proteinsynthese verwendet wird, was zu einem Stau im niedermolekularen Bereich führt, der erst mit fortschreitender Versuchsdauer abgebaut wird. Beim "Hydrazon" wird von Versuchsbeginn an bereits die Aufnahme von markierten Precursoren in die Zelle behindert, was sich dann natürlich auch in den Einbauraten im hochmolekularen Bereich niederschlägt. Ob das "Hydrazon" in gleicher Weise wie das

"Hydrazin" auch eine direkte Hemmwirkung auf die RNS- und Proteinsynthese ausübt, kann auf Grund dieses "überdecken-" Effektes nicht mit Sicherheit festgestellt werden. Da die spezifische Aktivität unter der Einwirkung des "Hydrazon" erheblich stärker abfällt als unter "Hydrazin"-Einfluß darf aber vermutet werden, daß der Hauptangriffspunkt des "Hydrazon" in einer Hemmung von Aufnahme und Verwertung der angebotenen Aktivität liegt, die jedoch von einer gleichzeitig vorhandenen Synthesehemmung begleitet sein kann. Die Untersuchung des säurelöslichen Zellpools erbrachte eine starke Phosphorylierungshemmung des Uracil durch "Hydrazin" und einen Mindergehalt an Triphosphat. Dieser Effekt ist beim "Hydrazon" und beim N,N-Dimethylhydrazin erheblich schwächer ausgebildet. Die Phosphorylierungshemmung kann mit ein Grund für den anfänglichen Aktivitätsstau im säurelöslichen Zellpool unter dem Einfluß von "Hydrazin" sein, da nur Triphosphate zur Polymersynthese verwendet werden können. Wie aus den Markierungsversuchen mit L-(U-¹⁴C)-Leucin für die Proteinsynthese hervorgeht, kommt ein solcher Stau aber auch durch eine direkte Synthesehemmung zustande.

E. Zusammenfassung

An Hefezellen (*Saccharomyces cerevisiae*) wurde die Wirkung von N-Methyl-N- β -chloräthyl-hydrazin ("Hydrazin") und seinem Benzaldehydhydrazon ("Hydrazon"), zwei neuen, cytostatisch wirksam gefundenen Substanzen, auf die Synthese von RNS und Protein untersucht.

Beide Stoffe hemmen summarisch Protein- und RNS-Synthese eindeutig und übertreffen darin das zum Vergleich mituntersuchte N,N-Dimethylhydrazin.

Die Analyse der Hemmwirkung mit Hilfe von ^3H -Uracil und ^{14}C -Leucin ergab im einzelnen zwischen den beiden neuen Stoffen erhebliche Unterschiede in ihren Angriffspunkten:

Das "Hydrazin" hat nach Befunden an synchronisierten "kleinen" Hefezellen während der Wachstumsphase, gemessen am ^3H -Uracileinbau, nur eine schwache Wirkung auf die RNS-Bildung; sie setzt erst beim Übergang in die Vermehrungsphase in vollem Umfang ein. Demgegenüber ist die Hemmwirkung des "Hydrazons" schon in der Wachstumsphase voll ausgeprägt. Bei der Proteinsynthese, gemessen am ^{14}C -Leucineinbau, besteht im zeitlichen Verlauf und in der Stärke der Hemmung zwischen den beiden Substanzen kein Unterschied.

Aus dem Verhalten der Aktivitäten von ^3H -Uracil und ^{14}C -Leucin im säurelöslichen Kaltextrakt aus den Hefezellen und aus dessen säulenchromatographischer Auftrennung ergeben sich zwischen "Hydrazin und "Hydrazon" weitere Unterschiede. "Hydrazin" führt bei verminderter RNS- und Proteinsynthese zu einem Anstau von Aktivität aus den angebotenen, markierten Substraten. Dabei ist der Aufbau des Uracils zum Nukleosid und damit auch zum Nukleotid gehemmt sowie der Gehalt an Triphosphat vermindert. Im Unterschied dazu setzt das "Hydrazon" die Aufnahme der beiden

markierten Substrate in die Zelle herab, während die Nukleotidbildung selbst aus Uracil nicht beeinflußt ist. Das "Hydrazon" wirkt membrandichtend.

F. Literaturverzeichnis

1. Pletscher, A., P. Zeller: Fortschritte der Arzneimittelforschung Vol. II, Basel-Stuttgart, Birkhauser 1960, 417.
2. Domagk, G., H.A. Otte, W. Sietken: Beitr. klin. Tuberkul. 107, 325 (1952).
3. Fox, H.H., J.T. Gibas: J. org. Chemistry 18, 983 (1953)
4. Valdecasas, F.G.: Med. clin. (Barcelona) 19, 275 (1952)
5. Drucy, J., B.H. Ringer: Helv. chim. Acta 34, 195 (1951)
6. Chiura, K., H.K. Reckendorf: The Nitrofurans, in:
G.P. Ellis, G.B. West: Progress in medicinal
chemistry, Bd. 5, 320.
7. Müller, E.: Med. Inauguraldissertation, Marburg 1960
8. Weitzel, G., F. Schneider, A.-M. Fretzdorf, J. Durst,
W.D. Hirschmann:
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chemie 348, 433
(1967)
9. Gold, J.: Ancology 27, 69 (1973)
10. Wilson, K.S., J.A. Ricci, A.J. Grobmeyer:
Cancer chemotherapy Reports, Part 1 Vol. 54,
243 (1970)
11. Prescott, B., G. Caldes: J. Pharm. Sci. 59, 101 (1970)
12. Toth, B., M. Rustja, Int. J. Cancer 2 413 (1967)
13. Shay, H., M. Gruenstein, M.-B. Shimkin, Cancer Res. 24,
998 (1964)
14. Toth, B., Cancer Res. 32, 2818 (1972)
15. Thurnherr, N., E.E. Deschner, E.H. Stonehill, M. Lipkin:
Cancer Res. 33, 940 (1973)
16. Lingens, F., H. Schneider-Bernlöhr, Liebigs Ann. Chem.
686, 134 (1965)
17. Bollag, W., E. Grunberg, Experientia (Basel) 19, 130 (1963)
18. Böhme, H., F. Martin, Arch. Pharmaz. 307, 272 (1974)

19. Schmährl, D.: Entstehung, Wachstum und Chemotherapie maligner Tumoren, Editio Cantor KG, Aulendorf, 301 (1970)
20. Preußmann, R., L. Satzinger, D. Schmährl, Angew. Chemie 70, 743 (1958)
21. Schulze, W., G. Letsch, J. prakt. Chem. (4), 14, 11 (1961)
22. de Kloet, S.R.: Biochem. J. 106, 167 (1968)
23. Zimmermann, F.K., R. Schwaier, U. v. Laer: Z. Vererbungslehre 98, 230 (1966)
24. Gale, G.R., Proc. Soc. exp. Biol. med. 119, 1004 (1965)
25. Zimmermann, F.K., R. Schwaier: Molec. Gen. Genetics 100, 63 (1967)
26. Young, D.K., D.E. Mahony and L. Whitehouse: J. Pharm. Sci. 60, 386 (1971)
27. Slater, M.L.: J. Bacteriol. 113, 263 (1973)
28. Siebert, D.: Mutation Research 17, 307 (1973)
29. Braun, R., W. Schmid, K. Stossek: Z. Naturforsch. 30c, 245 (1975)
30. Lange, W.: Med. Inaugural-Dissertation Marburg (1975)
31. Williamson, D.H., A.W. Scopes, Exp. Cell. Res. 20, 338 (1960)
32. Bray, G.A.: Mol. Biochem. 1, 279 (1960)
33. Grivell, A.R. and J.F. Jackson: J. Gen. Microbiol. 54, 307-317 (1968)
34. Eckstein, H.: Zeitschr. Naturforsch. 29c, 48 (1974)
35. Burton, K.: Biochem. J. 62, 315 (1956)
36. Slater, M.L.: J. Bacteriol. 113, 263-270 (1973)
37. Pflüger, K.-H.: Humanbiolog. Inaugural-Dissertation Marburg (1975)

Ulrike Mangold, geb. Säcker

L e b e n s l a u f

- | | | |
|------------------|---|---|
| 4. Mai 1950 | - | in Gelsenkirchen geboren als zweite Tochter des Elektro-Ingenieurs Kurt Säcker und seiner Ehefrau Christiane, geb. Wolf |
| 1956 - 1960 | - | Volksschulbildung bis zum 4. Schuljahr in Marl |
| 1960 - 1968 | - | Ausbildung am neusprachlichen Mädchen-gymnasium in Marl |
| 27. Mai 1968 | - | Ablegung der Reifeprüfung |
| 1968 - 1973 | - | Studium der Zahnheilkunde an der Philipps-Universität zu Marburg an der Lahn |
| 29. Sept. 1969 | - | naturwissenschaftliche Vorprüfung |
| 25. März 1971 | - | zahnärztliche Vorprüfung |
| 17. Dez. 1973 | - | zahnärztliche Prüfung |
| 24. Jan. 1974 | - | Approbation als Zahnärztin |
| Jan. - Juli 1974 | - | Arbeit an der Dissertation am Pharmakolo-gischen Institut der Philipps-Universität Marburg |
| 15. Dez. 1972 | - | Heirat mit dem Zahnarzt Reiner Mangold |
| seit August 1975 | - | Tätigkeit als Assistenzzahnärztin in Bremen. |

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren:

Amon, Braun, Castenholz, Dehnicke, Dimroth, Engelhardt, Frenzel, Goebell, Haan, Hennis, Hering, Heuser, Ihm, Janke, Karlson, Keil, Koecke, Korb, Kühnel, Niemeyer, Oehmig, Petry, Pfütz, Riecken, Rohen, Rosemann, Rupec, Schiff, Schmid, Schmidt, Schmitz-Moormann, Seidel, Walcher.

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Walter Schmid, Direktor des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Marburg, Lahnberge, für die freundliche Überlassung des Themas, die Übernahme des Referates sowie für die großzügige Bereitstellung von technischen und finanziellen Mitteln zur Durchführung dieser Arbeit danken. Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Doz. Dr. Rainer Braun, der mir durch vielseitige Anregungen hilfreich zur Seite stand. Der tatkräftigen Hilfe von Frau Speicher verdanke ich den reibungslosen technischen Ablauf der Versuche und die Anfertigung der zahlreichen Abbildungen dieser Arbeit.

